

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1930-31

N° 8

**Exposé Critique et Recherches
Expérimentales sur la précipitation
des protides du lait**

(INFLUENCE DU FORMOL)

THÈSE

**pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)**

Présentée et soutenue le Avril 1931

PAR

ÉMILE BOUCHARA

Pharmacien Lauréat de la Faculté
Interne des Hôpitaux de Paris
Licencié ès-sciences

JURY { MM. GRIMBERT, Président.
BOUGAULT, Professeur.
FLEURY, Agrégé.

EDITIONS ALBERT MECHELINCK

10, Rue Victor-Cousin

PARIS

—
1931

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1930-31

N° 8

**Exposé Critique et Recherches
Expérimentales sur la précipitation
des protides du lait**

(INFLUENCE DU FORMOL)

THÈSE

**pour l'obtention du diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(Pharmacie)**

Présentée et soutenue le Avril 1931

PAR

ÉMILE BOUCHARA

Pharmacien Lauréat de la Faculté
Interne des Hôpitaux de Paris
Licencié ès-sciences

JURY { MM. GRIMBERT, Président.
BOUGAULT, Professeur.
FLEURY, Agrégé.

EDITIONS ALBERT MECHELINCK

10, Rue Victor-Cousin

PARIS

—
1931

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, Doyen, O. ✱, ☉ I.
 PERROT, Assesseur, O. ✱, ☉ I.
 G. DURSANT, Secrétaire, ✱, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. RADAIS, O. ✱, ☉ I.....	Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut, G. O. ✱, ☉ I.....	Chimie organique.
PERROT, O. ✱, ☉ I.....	Histoire naturelle et Médicaments.
COUTIÈRE, O. ✱, ☉ I.....	Zoologie.
LEBEAU, O. ✱, ☉ I.....	Pharmacie chimique.
GUERBET, ✱, ☉ I.....	Toxicologie.
BOUGAULT, ✱, ☉ I.....	Chimie analytique.
GORIS, ✱, ☉ I.....	Pharmacie galénique.
GUÉRIN, ✱, ☉ I.....	Botanique générale.
TASSILLY, ✱, ☉ I.....	Physique.
DAMIENS, ✱, ☉ I.....	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. ✱, ☉ I.....	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ☉ I.....	Hydrologie et Hygiène.

Professeurs honoraires : MM. A. VILLIERS, ✱, ☉ I, GRIMBERT, ✱, ☉ I. et
 DÉLÉPINE, O. ✱, ☉ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONNORAT, ✱, ☉ I.....	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LUTZ, ✱, ☉ I.....	Cryptogamie.
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.....	Pharmacodynamie.
FABRE, ☉ I.....	Minéralogie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

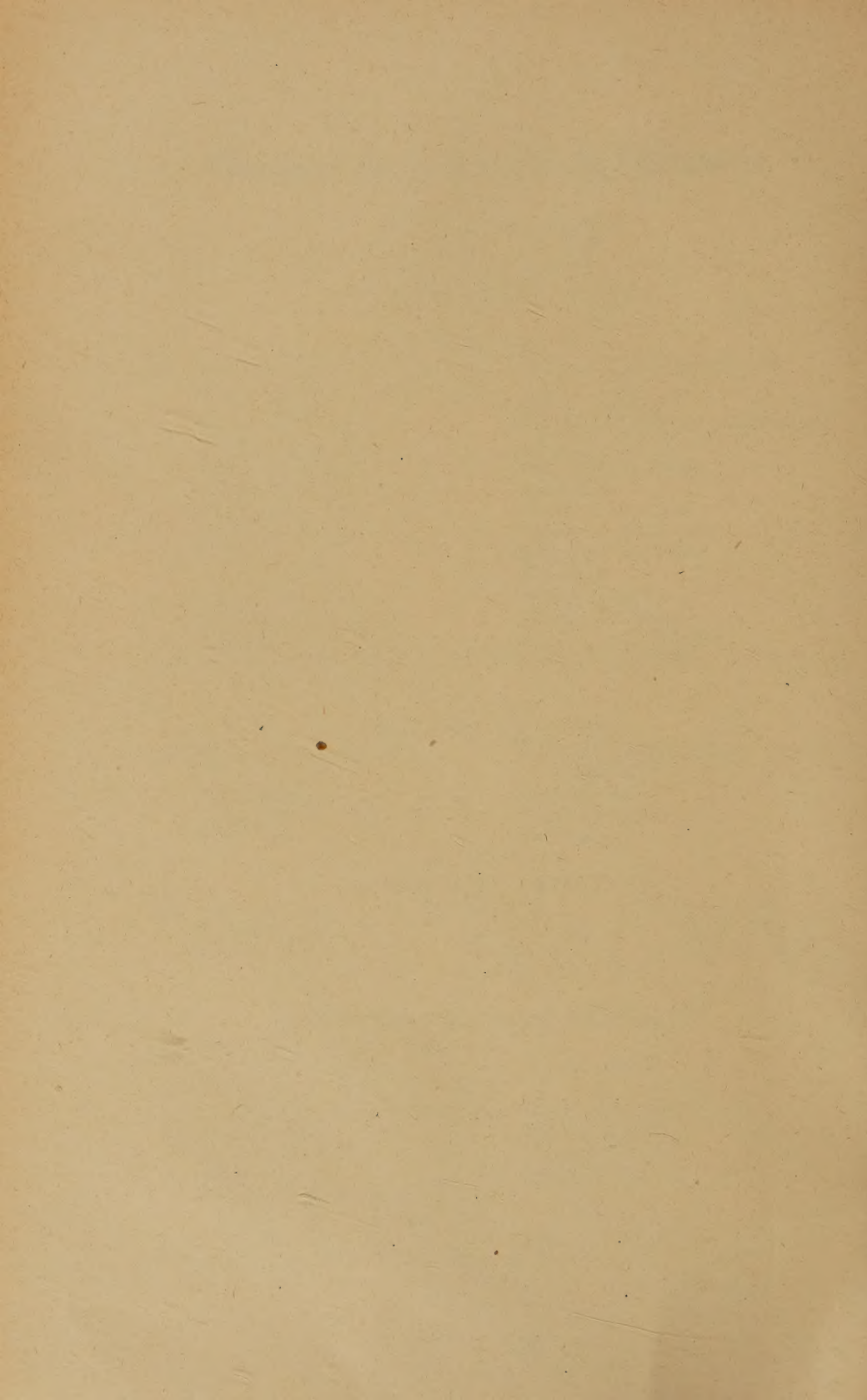
MM. LUTZ, ✱, ☉ I.	MM. PICON, ☉ I.	MM. BACH, ☉ I.
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.	FABRE, ☉ A.	BEDEL, ☉ I.
DELABY, ✱, ☉ A.	MASCRÉ, ☉ I.	RÉGNIER, ☉ I.
	FLEURY, ☉ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ☉ I., agrégé, chargé des T. P. de 1 ^{re} année.....	Chimie générale.
FABRE, ☉ I., et RÉGNIER, ☉ I, agrégés, chargés des travaux de	Chimie analytique.
SOUÈGES, ☉ I.....	Micrographie.
LEROUX, ☉ I.....	Physique.
DEVAL, ☉ I.....	Microbiologie.
DELABY, ✱, ☉ A., PICON, ☉ I., et FLEURY, ☉ I., agrégés, char- gés des.....	Travaux généraux de 4 ^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, ☉ I.





A LA MÉMOIRE INOUBLIABLE DE MON PÈRE

*Que son souvenir trouve dans ce
modeste travail le témoignage
de ma piété filiale et de mon
inaltérable affection.*

A MA MÈRE

*Témoignage affectueux de mon
entier dévouement.*

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GRIMBERT

Membre de l'Académie de Médecine
Pharmacien en chef honoraire des Hôpitaux
Chevalier de la Légion d'Honneur

Respectueux hommage.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR BOUGAULT

Professeur de Chimie analytique à la Faculté de Pharmacie
Pharmacien des Hôpitaux de Paris
Chevalier de la Légion d'Honneur

En témoignage de profonde reconnaissance pour la bienveillante sympathie avec laquelle il a accepté de faire partie du Jury.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ P. FLEURY

Pharmacien chef des Asiles de la Seine

Hommage de respectueuse reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ M. MASCRÉ

Pharmacien des Hôpitaux de Paris

En témoignage de profonde gratitude et de respectueux attachement.

INTRODUCTION

Ce travail nous a été indiqué par le Professeur agrégé MASCRÉ. A la suite d'observations d'ordre cytologique sur la fixation des constituants de la cellule végétale [123], il était amené à envisager l'influence du formol sur la précipitation quantitative des protides dans les liquides biologiques. En même temps qu'avec HERBAIN il étudiait cette influence sur la précipitation des protides du sérum, il étudiait avec nous son influence sur la précipitation des protides du lait [124]. Les premières expériences nous ayant paru intéressantes, il nous conseillait de poursuivre et d'approfondir l'étude des phénomènes observés.

Il nous a fallu d'abord définir la composition azotée du lait. Elle a été longtemps controversée, aussi en avons-nous fait l'historique. De nos jours, l'existence des trois protéines caséine, lactalbumine, lactoglobuline n'est plus contestée. L'étude particulière de chacune d'elles termine la première partie.

Nous avons pensé qu'il serait utile de rassembler, de classer, d'exposer et de faire l'examen critique des nombreux travaux consacrés à la séparation des diverses protéines du lait. C'est l'objet de la deuxième partie qui comprend quatre chapitres :

- 1° Dosage en bloc des protéines.
- 2° Méthodes de dosage de la caséine.
- 3° Méthodes de préparation de la caséine pure.
- 4° Séparation de la lactalbumine.

La troisième partie expose les méthodes analytiques utilisées au cours de ce travail. Ayant eu à doser l'azote des éléments azotés du lait, nous avons établi la limite de sensibilité de la méthode au formol de RONCHÉSE avant d'adopter le procédé plus sensible par déplacement et distillation de l'ammoniaque.

Dans la quatrième partie, nous rapportons les rares observations se rattachant directement à notre sujet, nous définissons nos conditions d'expériences, puis nous étudions l'influence du formol sur la précipitation des protéines en faisant varier le réactif précipitant. Nous tentons d'expliquer les phénomènes observés en tenant compte de la libération d'acidité due au formol et de son action sur des mélanges synthétiques de protéines. A cette occasion, nous avons préparé de la caséine pure dont nous avons déterminé certaines constantes.

La cinquième partie a trait au lait de femme; après quelques généralités, nous précisons les rapports de sa caséine avec celle du lait de vache. Nous faisons l'historique des méthodes de dosage de sa caséine et enfin nous étudions l'influence du formol sur la précipitation quantitative de ses protéines.

Avant d'exposer le détail de ces recherches, nous tenons à exprimer notre respectueuse reconnaissance à M. le Professeur GRIMBERT qui nous a fait l'honneur de nous admettre parmi ses élèves et de présider la soutenance de cette thèse.

Nous remercions M. le Professeur BOUGAULT d'avoir consenti à faire partie du jury et l'assurons de notre profond dévouement.

C'est aussi pour nous un très agréable devoir d'adresser à M. le Professeur agrégé MASCRÉ nos sentiments de reconnaissance et de respectueuse affection, pour s'être révélé à nous autant comme un ami que comme un maître.

M. le Professeur agrégé FLEURY a bien voulu s'intéresser à nos recherches et nous aider avec la plus grande bienveillance de ses conseils éclairés, qu'il trouve ici l'expression de notre vive gratitude.

Nous adressons nos sincères remerciements au Conseil de la Faculté de Pharmacie de Paris qui nous a accordé une subvention sur les fonds du legs MOISSAN et nous remercions M. le Professeur RADAIS, Doyen de la Faculté, de l'intérêt qu'il n'a cessé de nous porter durant notre scolarité.

HISTORIQUE

CHAPITRE I

De la composition azotée du lait

Le lait, sécrétion de la glande mammaire, est une émulsion d'une matière grasse, le beurre, dans un sérum. Ce dernier renferme un glucide, le lactose, des protéines en solution et en pseudo-solution, des sels minéraux et des ferments solubles.

La proportion moyenne des différents éléments du lait de vache est la suivante :

	Par litre
Eau	900-910 g.
Extrait sec	130-135 g.
Lactose anhydre	50 g.
Lipides	40 g.
Matières azotées	35-37 g.
Matières salines	9-9,50 g.

Ces chiffres n'ont rien d'absolu; ils peuvent varier dans de larges limites. La composition du lait ainsi énoncée ne nous apprend rien quant à sa constitution et plusieurs problèmes physico-chimiques se posent lorsqu'il s'agit de l'établir.

La matière grasse existe en suspension dans le lactoplasma sous forme de petites sphères de diamètre variable (1 à 15 μ). La stabilité de l'émulsion serait assurée d'après certains auteurs, STORCH [198] en particulier, par une membrane d'enveloppe entourant les globules gras. « Mais aucune démonstration sérieuse n'a été faite de l'existence d'une telle membrane et la stabilité de l'émulsion ne peut être attribuée qu'à des causes physiques ». — GRIMBERT [73].

Les protéines interviennent pour une grosse part dans le maintien de cet équilibre. TITUS, SOMMER et HART [203] ont

vérifié récemment que la protéine enveloppant la matière grasse est très voisine, sinon identique à la caséine, contrairement à l'opinion admise couramment. Le beurre est donc maintenu en suspension, grâce aux protéines; celles-ci existent dans le lait en partie dissoutes et en partie à l'état colloïdal.

Que sont ces protéines, quel est leur nombre, sous quel état se rencontrent-elles dans le lait? Voilà autant de points que nous allons essayer de préciser.

La définition et la séparation des éléments azotés existant dans le lait ont fait l'objet de nombreuses controverses. De nos jours, la question semble résolue, grâce aux notions précieuses introduites dans la chimie des protéines, par nos connaissances plus approfondies des lois régissant l'état colloïdal.

Dans le sens le plus général, la caséine définit la matière albuminoïde du lait. GEOFFROY [68], MALOUIN [119], LUDOLF [114] et WOLTELEN [221], les premiers signalent l'existence d'une matière « caséuse » propre au lait. MACQUER [116] l'étudie avec soin. La caséine est alors connue sous le nom de caséum, de caséus fromage. Le changement de dénomination date du mémoire de DUMAS et CAHOURS [53] paru en 1842. DEYEUX et PARMENTIER [46] montrent que la matière caséuse n'est pas identique quant à ses propriétés physiques, dans tous les laits. PROUST [163] et BRACONNOT [27] observent que le caséum subit la putréfaction et donne les mêmes produits de décomposition que les autres matières albuminoïdes. « Son existence est admise dans le sérum du sang, dans le liquide musculaire, dans le contenu de certains kystes, dans le jaune d'œuf, dans le suc parenchymateux du thymus, dans le liquide allantoïque, etc... » MARIE [121].

D'ailleurs pour LIEBIG, CH. GERHARDT [69], SOXHLET [192], EICHWALD [55], toutes les substances albuminoïdes sont identiques :

« Il y aurait un principe unique, un acide faible qui, tantôt soluble, tantôt insoluble constituerait l'albumine, la caséine, la fibrine, suivant qu'il serait ou non combiné avec les alcalis ou mélangé avec des sels étrangers. Si l'on conserve à ce principe le nom d'albumine, on peut dire que le blanc d'œuf et le sérum, solubles et coagulables par la chaleur sont formés de bialbuminate de soude, que la caséine du lait, soluble et in-

coagulable par la chaleur, représente de l'albuminate neutre de potasse, et que la fibrine est l'albumine insoluble ou coagulée plus ou moins mélangée de phosphates terreux. »

La difficulté et souvent l'impossibilité d'obtenir des substances albuminoïdes naturelles privées de matières minérales c'est-à-dire absolument pures, avaient fait admettre l'impossibilité de démontrer par l'analyse la pluralité de ces substances. D'autre part, elles fournissent les mêmes produits de décomposition. Par ces motifs, NAQUET [139] estime encore en 1867 que l'hypothèse de l'identité reste justifiée. Pourtant, une des conclusions les plus générales du travail d'analyse de DUMAS et CAHOURS [53] sur les « Matières azotées neutres de l'organisation », affirmait l'existence de plusieurs espèces de substances albuminoïdes dans la nature.

En 1873, par l'étude des pouvoirs rotatoires, BÉCHAMP [14] démontre l'impossibilité de soutenir qu'un principe unique, combiné ou mélangé avec des substances variables, puisse constituer toutes les matières albuminoïdes.

SCHUBLER [184] chauffe le sérum qui s'écoule de la précipitation de la caséine par les acides, observe un précipité, l'appelle « serai » ou « serac » et en fait une espèce chimique.

En 1859, HOPPE SEYLER [84], par transsudation du lait au travers des parois d'un uretère humain lavé à l'alcool, obtient un liquide opalescent dans lequel le chauffage détermine un précipité auquel il reconnaît les propriétés des albuminoïdes; il le nomme d'ailleurs albumine. Il signale qu'en dehors de la caséine et de l'albumine, le lait contient d'autres éléments azotés.

BOUCHARDAT et QUEVENNE [26] isolent l'Albuminose en traitant par le tanin, des lactosérums ne donnant plus de précipité par les acides et la chaleur. Du petit lait, MILON et COMMAILLE [133] retirent la Lactoprotéine, MORIN [137], la Galactine, SCHMIDT, l'Hémialbuminose, HAMMARSTEN [75], la Molkenprotéine, LEHMANN, des peptones..... et j'en passe (1).

(1) D'après Porcher, tous ces produits : albuminose, lactoprotéine, galactine, hémialbuminose... seraient tout simplement un dérivé acéto-soluble prenant naissance dans l'action à chaud de l'acide acétique (employé comme réactif de la caséine) sur la caséine résiduelle et l'albumine du lait.

Reprenant cette étude de la différenciation des éléments azotés du lait, DANILEWSKY et RADENHAUSEN [40] font table rase de tous les principes isolés précédemment et reconnaissent comme protéine principale du lait, la Caséoprotalbine. Dans le lactosérum, ils trouvent quatre matières albuminoïdes : l'orroprotéine, l'albumine, la lactosyntoprotalbine et le lactosyntogène. Ils décrivent aussi une peptone, une pseudo-peptone...

Pour PFEIFFER [151] et BIEDERT [19], il y aurait dans le lait quatre caséines : la caséine A précipitable par les acides et la présure, la caséine B précipitable par la chaleur, la caséine C obtenue par addition de présure à 25° lorsque les caséines A et B ont été séparées, enfin la caséine D incoagulable, mais précipitable par le tanin.

Devant cette éclosion de principes posés comme espèces distinctes et dans le désir d'unifier la composition du lait, DUCLAUX [49,50] s'attache à démontrer la fragilité des conclusions tirées par les auteurs. Avec raison, il fait remarquer que « depuis le moment où l'étude de la matière albuminoïde du lait a été ébauchée, les notions nouvelles, au lieu d'éclairer les idées anciennes, semblent les avoir rendues confuses ».

Pour lui, le lait ne contient que de la caséine. Ceux qui ont cru isoler de l'albumine ont fait erreur. Leur albumine était tout simplement de la caséine soluble.

« La caséine authentique, écrit-il, possède dans les conditions ordinaires ou peut acquérir sous l'action de l'eau et du temps toutes les propriétés et toutes les réactions dont on a pu se faire un argument pour l'établissement d'espèces chimiques nouvelles; de sorte que, dans mon opinion, le lait ne renferme, en fait de matière albuminoïde, que de la caséine à divers degrés de solution ». Toutes ses expériences l'amènent à conclure qu'« à l'état de solution parfaite, les matières albuminoïdes du lait se confondent et ne commencent à différer qu'à l'état muqueux ou à l'état solide, c'est-à-dire lorsque, entrent en jeu des questions, non de constitution mais d'aggrégation moléculaire ».

Cette conception de Duclaux, sur l'unité substantielle de la matière albuminoïde du lait, a été à la fois vivement soutenue et combattue. Ainsi LIBERKHUN, PETERS [148], STORCH [196]

prétendent que le lait frais contient seulement de la caséine; tous les principes isolés, soi-disant différents, ne sont que des produits de son altération.

BÉCHAMP [15], en cherchant un procédé de préparation de la caséine, découvre deux matières albuminoïdes : la Lactalbumine coagulable par l'alcool et la Galactozymase soluble après ce traitement. Leur somme représente $1/20^e$ de la caséine. DUMAS [51], dans une note à l'Académie, confirme ces résultats :

« Dans quelques recherches sur le lait de vache, j'ai constaté, comme M. BÉCHAMP, mais par d'autres moyens, la présence de trois matières albuminoïdes distinctes, la caséine demeurant toutefois très prépondérante par sa quantité relative. »

HAMMARSTEN prouve l'existence d'une albumine et d'une globuline. Il donne une excellente méthode de préparation de la caséine pure que nous décrirons plus loin.

SEBELIEN [186] étudie les propriétés des deux substances décrites par HAMMARSTEN, comme lactalbumine et lactoglobuline. Il les prépare, en fait des solutions, et montre qu'elles possèdent les propriétés des albumines et des globulines, leur solubilité, leur coagulabilité, leur précipitabilité; la lactoglobuline ne peut pas être considérée comme un reste de caséine modifiée non précipitée. La lactalbumine possède un pouvoir rotatoire bien distinct de celui attribué à la caséine dans les mêmes conditions.

ARTHUS [8] divise le groupe des substances albuminoïdes naturelles en deux classes : la classe des « albuminoïdes coagulables » subdivisée elle-même en deux sous-classes : les albumines et les globulines, et la classe des « albuminoïdes non coagulables » : les caséines. Le lait, d'après ses expériences, contient à côté de la caséine une ou plusieurs substances coagulables (albumine-globuline).

L'albumine prend, dès lors, droit de cité parmi les albuminoïdes solubles du lait. Cependant, LINDET et AMMANN [111] en 1906 reprennent cette question qui paraissait définitivement tranchée. Pour eux, la lactalbumine n'est pas autre chose qu'une caséine solubilisée par les éléments minéraux du lac-

toplasma ; ils l'appellent CASÉINE β . Elle est distincte de la CASÉINE α existant pour 9/10° en suspension colloïdale et pour 1/10° en dissolution dans le lait.

Toutes deux présentent des propriétés analogues : « coagulation ménagée par la chaleur, précipitation au moyen de l'acide phénique, solubilité identiquement influencée par le chlorure de calcium. »

Elles diffèrent surtout par le pouvoir rotatoire :

CASÉINE α		$[\alpha]_D$	=	—	116°
CASÉINE β		$[\alpha]_D$	=	—	30°

D'autre part, la caséine β est insoluble dans les solutions salines concentrées, c'est ce qui a permis à SEBELIEN de la séparer de la caséine et c'est elle qu'il nomme albumine.

Ces conclusions s'éloignent donc de celles de DUCLAUX qui ne reconnaissait qu'une seule et même caséine en solution et en suspension.

BEAU [12, 13] fait remarquer que le lait est un édifice particulièrement sensible aux réactifs chimiques, vu l'instabilité de l'état colloïdal ; celui-ci est détruit par les agents les plus faibles. De plus, les colloïdes du lait sont irréversibles et c'est une raison pour laquelle ils sont si mal connus. Aussi, comme on ne peut rien préjuger de l'état des protéines du lait, il propose d'appeler :

1° *Lactéine*, l'ensemble des matières albuminoïdes du lait à l'état où cet ensemble se trouve dans le lait.

2° *Caséine*, le produit de la coagulation résultant de l'action de la présure ou d'un acide sur le lait à froid (majeure partie de la caséine α de LINDET).

3° *Albumine*, le produit de la coagulation résultant de l'action de la chaleur sur le lait (totalité de la caséine β et reste de la caséine α).

Quant à la lactéine, nous n'avons sur elle aucune donnée précise. « Nous savons simplement qu'elle est formée de matières albuminoïdes voisines, qu'une grande portion au moins, est à l'état colloïdal et sous forme de micelles en suspension, qu'elle a un pouvoir rotatoire global compris entre — 30° et — 116°, enfin qu'elle peut cailler, c'est-à-dire perdre son état

colloïdal et s'insolubiliser, sans doute en se transformant simultanément, caractère commun à tous les colloïdes ». Sa constitution nous est totalement inconnue ; elle n'est pas un mélange ou une combinaison de caséine et d'albumine, car rien ne prouve que ces deux dernières préexistent dans le lait telles que nous les connaissons hors du lait.

Mais BEAU ne donne pas de méthode permettant d'isoler la lactéine. Certes, les réactifs chimiques sont des agents souvent violents ; peut-être, tirons-nous de leurs actions des conclusions qui nous donnent des images déformées de la réalité ; néanmoins, les méthodes nouvelles ont apporté des notions particulièrement intéressantes sur la nature et les rapports des protéines du lait, qui vont nous aider à mieux comprendre les phénomènes observés.

La conception du point isoélectrique introduite par HARDY [79] en 1900 et son rapport avec la précipitation des colloïdes a modifié complètement la chimie-physique des protéines.

Le point isoélectrique peut être défini : la concentration des ions H pour laquelle les particules colloïdales ne se dirigent ni vers l'anode, ni vers la cathode, sous l'influence du courant.

« A mesure qu'on s'en approche, la stabilité de l'hydrosol diminue jusqu'à s'évanouir, en ce point où se produit la coagulation ou la précipitation, suivant que la concentration de la protéine est forte ou faible et cela, que le point isoélectrique ait été atteint lentement ou rapidement, avec ou sans agitation mécanique. » (HARDY)

La détermination rigoureuse du point isoélectrique est possible depuis que SORENSEN a indiqué une méthode de mesure de la concentration des ions H. Le point isoélectrique de la caséine est à $\text{pH} = 4,6 - 4,7$. Il se confond avec l'optimum de floculation.

Les protéines sont des électrolytes amphotères qui, d'après LÖB [112], sont susceptibles d'exister sous trois états différents selon la concentration des ions H :

- 1° à l'état de protéine isoélectrique ou non ionogénique ;
- 2° à l'état de protéinates métalliques, ordinairement alcalins ou alcalino-terreux ;

3° à l'état de sels acides de protéines — chlorure, sulfate de protéine, etc...

Pour avoir la protéine débarrassée d'impuretés ionogéniques, il suffira donc de la coaguler au point isoélectrique. Cette méthode, dictée par des considérations théoriques, est devenue un procédé industriel de préparation des protéines pures et peut servir à leur séparation, lorsqu'on a affaire à des mélanges. Appliquée au lait, elle a permis d'en isoler de la caséine, de l'albumine et de la globuline. De nos jours, l'existence de ces trois protéines n'est plus contestée et rend compte de la plupart des faits observés.

OSBORNE et WAKEMAN [143] prétendent avoir isolé des liquides alcooliques de lavage de la caséine une quatrième protéine ressemblant à la gliadine du blé. Son existence, en tant que principe défini, est encore discutable. Aussi admettrons-nous essentiellement comme constituants protéiques du lait : la caséine, une albumine et une globuline.

Avant de les étudier individuellement, voyons dans quelle proportion elles entrent dans la composition azotée du lait.

Matières azotées par litre de lait

Protéines.	{ Caséine	28 à 32 g.
	{ Albumine	4 à 5 g.
	{ Globuline	1 g. 5 à 2 g. 5
Acides aminés (d'après Pichon-Vendeuil)		
[153]		1 g.
Urée (d'après Morimoto) [136]		
		0 g. 25
Groupe de la Purine, Acide Urique (d'après Denis et Minot) [45]		
		0 g. 017
Groupe de la Guanidine (d'après Voegtlin et Sherwin) [217]		
		0 g. 012 à 0 g. 015

CHAPITRE II

Étude des constituants azotés du lait

A) La Caséine

I. — PROPORTION

La caséine, produit spécifique de la sécrétion mammaire, est la protéine la plus abondante du lait. Elle constitue 75 à 85 p. 100 de l'ensemble protéique et représente 85 à 90 p. 100 de l'azote total. Les laits qui en contiennent une forte proportion — type lait de vache — portent le nom de laits caséineux. Ils s'opposent aux laits albumineux — type lait de femme — dans lesquels la proportion de caséine atteint seulement 50 à 60 p. 100 des protéines, soit 45 à 55 p. 100 de l'azote total. Voici les valeurs obtenues par quelques auteurs pour le rapport :

Caséine
Albumine+Globuline

	LAIT DE VACHE	LAIT DE FEMME
STOHMANN [195]	6/1	1/1
LEHMANN [81]	10/1	2.4/1
PORCHER [160]	5.6/1	1/1

Pour ce rapport, nous avons trouvé des chiffres assez différents d'un lait à l'autre. Relevons les plus typiques :

Lait de vache : 5,2/1 — 7,2/1 — 9,6/1 — 11/1 — 12,8/1.

Ces résultats montrent combien sont variables les proportions relatives des éléments azotés du lait; ils expliquent les chiffres si souvent différents rencontrés dans les mémoires. Cependant, la valeur moyenne de ce rapport est 8 - 9, le plus généralement.

II. — SOLUBILITE

a) Dans l'eau.

Contrairement à ce que l'on croyait, d'après BERZÉLIUS, la caséine n'est point une matière soluble que les acides rendraient insoluble en la coagulant; elle est naturellement insoluble dans l'eau. Plus exactement, elle est un peu soluble lorsqu'elle vient d'être fraîchement précipitée. BÉCHAMP [16], après broyage dans l'eau pour la bien diviser, a obtenu entre 15° et 25° après 52 heures d'infusion, une solution en contenant 1 g. 005 par litre. Pour COHN et HENDRY [33], sa solubilité dans l'eau à 25° est :

$S=0$ g. 11 par litre.

Cette solubilité représente la somme des concentrations des molécules de caséine et des ions, en lesquels elles se dissocient.

b) Dans les solutions salines.

Elle est soluble dans les solutions de sels neutres comme l'a montré HAMMARSTEN [76] en 1878, sur de la caséine fraîchement préparée. Cette propriété, dans une certaine mesure, la rapproche des globulines. DRECHSEL [48] a reconnu sa solubilité dans les solutions de chlorure de sodium à 5, 10 et 15 p. 100, LIMBOURG [108] dans celles de nitrate de potasse, ARTHUS [8] dans celles de fluorure de sodium (1). Elle se dissout aussi dans les solutions d'oxalate de sodium (2), de po-

(1) En solution à 1 %, le fluorure de sodium dissout la fibrine et la caséine. Les solutions se font lentement à la température ordinaire, plus facilement à 40° et très rapidement à l'ébullition. Les solutions fluorées de caséine diffèrent des solutions alcalines, terreuses, phosphoalcalines et phosphoterreuses par deux caractères :

1° leur précipitabilité par CO_2 et la dilution;

2° leur non précipitation par NaCl à saturation à froid.

(2) Luning et Herzig [115] se sont servis de cette propriété pour différencier et doser la lactalbumine et la caséine dans un mélange de ces deux substances. La caséine fraîche est soluble à chaud dans une solution d'oxalate de sodium à 1 % alors que la lactalbumine y est insoluble ou presque.

En déterminant l'azote contenu dans la solution par la méthode de Kjeldahl, on déduit la proportion de caséine.

tassium, d'ammonium à 1 p. 100 et dans celles de chlorure et de sulfate d'ammonium mais en quantité moindre.

III. — POUVOIR ROTATOIRE

Le premier mémoire paru sur la question est dû à HOPPE-SEYLER [85]. Les solutions de caséine sont lévogyres. Pour obtenir des résultats réellement exacts, il faut employer des solvants sans action sur elle, le pouvoir rotatoire d'une substance en dissolution est modifié par la nature du solvant, lorsque celui-ci peut s'y combiner.

T. MARIE [121] en 1893, expérimentant sur des solutions de caséine dans l'oxalate de potassium et le fluorure de sodium, trouve :

$$[\alpha]_D = -80^\circ \text{ dans } C^2O^4K^2$$

$$[\alpha]_D = -86.6^\circ \text{ dans } FNa$$

et ZAYKOWSKY [226] dans l'acétate de potassium :

$$[\alpha]_D^{18^\circ} = -81.55$$

Dans les mêmes conditions (1), les différentes caséines que nous avons préparées nous ont fourni comme valeur moyenne du pouvoir rotatoire spécifique :

$$[\alpha]_D^{18^\circ} = -82.10$$

ce qui confirme le résultat de ZAYKOWSKY.

Dissoute dans l'acide chlorhydrique étendu, elle a pour pouvoir rotatoire spécifique -87° et dans l'acide phosphorique -99.1 .

En solution alcaline (2), potasse, soude, ammoniacque, le

(1) Un gramme de caséine dissoute dans 100 cm³ de solution d'acétate de potassium à 5 %. Si la concentration du solvant augmente, le pouvoir rotatoire spécifique diminue.

(2) Rapportons une de nos expériences :

Solvant : Solution aqueuse contenant 1 g. de lessive de soude (densité = 1.332) pour 1.000.

Volume de la solution.....	50 cm ³
Poids de la caséine.....	0 g. 194
Longueur du tube.....	2 dm.
Déviation observée	- 58'

$$D'où [\alpha]_D^{18^\circ} = -124.57$$

pouvoir rotatoire, qui est celui des caséinates correspondants, est compris entre -110° et -133° (BECHAMP [16], LINDET [111]).

IV. — CARACTERE AMPHOTERE

La caséine possède des propriétés acides étudiées par de nombreux auteurs : SACKUR [177], LAQUEUR [102], BUGURSKY et LIEBERMANN, SØRENSEN, ROBERTSON, PAULI, NORTHROP [141]. C'est un acide plus puissant que l'acide carbonique qui ne la déplace pas de ses solutions salines (SOLDNER [191]). Elle fonctionne comme un acide polyvalent tétra, penta ou hexa basique. En conséquence, elle donne des solutions parfaites avec les alcalis. ROBERTSON [173] a montré que la quantité de caséine dissoute dans les solutions alcalines et alcalino-terreuses, en fonction du temps, est donnée par la relation :

$$x = K \times T^m$$

dans laquelle x est la quantité de caséine dissoute, T le temps, K et m des constantes dépendant de la concentration, de la nature de la base et aussi de la masse totale de caséine dans le mélange.

Les caséinates formés sont de véritables sels s'ionisant en solution aqueuse; on en connaît de nombreux. VAN SLYKE et BOSWORTH [25, 211] ont préparé les suivants :

- 1° Caséinate monocalcique.
- 2° Caséinate dicalcique.
- 3° Caséinate de calcium pentavalent neutre au tournesol.
- 4° Caséinate de calcium octovalent neutre à la phtaléine.

VAN SLYKE et WINTER [214] ont obtenu avec le magnésium :

- 1° Un caséinate monomagnésien insoluble dans l'eau.
- 2° Un caséinate dimagnésien légèrement soluble dans l'eau.
- 3° Un caséinate de magnésium pentavalent neutre au tournesol.

4° Un caséinate de magnésium octovalent soluble dans l'eau et neutre à la phtaléine.

La caséine est soluble aussi dans les acides concentrés avec lesquels elle se combine. C'est ainsi qu'on peut obtenir des solutions de caséine dans l'acide acétique. L'acide la démi-

néralise et la rend très soluble : LINDET [110] a montré qu'une caséine est d'autant plus soluble dans le sérum qu'elle est moins minéralisée. Ces observations nous seront très précieuses quand nous parlerons de son dosage.

Schématiquement, nous pouvons avec LÆB [112] représenter de la manière suivante le caractère amphotère de la caséine.



sera le symbole de la caséine, étant bien entendu que dans sa molécule, il n'y a pas qu'un seul groupe CO^+H et NH^+ entrant en réaction. Si nous mettons entre crochets la partie qui ne réagit pas, la caséine isoélectrique sera représentée par le schéma :



Elle ne peut en effet se combiner ni aux anions, ni aux cations. Du côté alcalin du point isoélectrique, seuls les groupes CO^+H de la molécule sont susceptibles de réagir et la caséine devient alors :



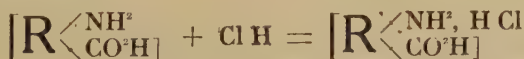
A cet état, elle se comporte comme un polyacide; en présence de $NaOH$, il se fait du caséinate de sodium :



Du côté acide du point isoélectrique, seuls les groupes NH^+ de la molécule sont susceptibles de réagir et la caséine devient :



Sous cette forme elle se comporte comme NH^+ , ainsi que l'ont montré WERNER [218], LEWIS [105], KOSSEL [98], LANGMUIR [101]. Elle fixe HCl pour donner un chlorure de caséine suivant le processus :



Ce corps se dissocie électrolytiquement de la manière suivante :



V. — COMPOSITION ELEMENTAIRE

La caséine appartient au groupe des phosphoprotéines, encore appelé pseudo ou para-nucléoprotéines. Elle est à la fois phosphorée et sulfurée; le pourcentage de ces deux éléments n'est pas établi de façon certaine, ainsi qu'il ressort du tableau suivant donnant la composition élémentaire de la caséine du lait de vache :

HAMMARSTEN [77]	CHITTENDEN PAINTER	VAN SLYKE et BOSWORTH [210]	DUCLAUX	VLADESCO [216]	SEBELIEN [186]
C. 52.96	53.30	53.50			
H. 7.05	7.07	7.13			
N. 15.65	15.91	15.80			
P. 0.847	0.84 à 0.89	0.710	0.750	0.880	0.800
S. 0.716	0.820	0.720			

Le chiffre de phosphore le plus bas est celui donné par VAN SLYKE et BOSWORTH. Ces auteurs prétendent qu'il est impossible, dans les conditions ordinaires de préparation de la caséine, d'enlever le phosphore inorganique qui y est adsorbé. Pour y arriver, il faut laisser la caséine en contact pendant 12 heures avec de l'oxalate d'ammoniaque en milieu ammoniacal : sa teneur en phosphore passe alors de 0,8 à 0,7 p. 100.

C'est un fait qu'il est très difficile de précipiter la caséine sans entraîner du phosphate de chaux (1). Elle existe dans le lait, ainsi qu'il résulte des travaux de PORCHER, sous forme de caséinate de calcium uni colloïdalement à du phosphate de chaux insoluble. L'existence de ce complexe « Caséinate de calcium + Phosphate de calcium » a déjà été signalée par HAMMARSTEN [77]; c'est lui que LINDET et AMMANN [111] appelaient phosphocaséinate de chaux.

(1) Lindet [109] considère que la moitié environ du phosphore contenu dans la caséine d'empréurage est à l'état de phosphate de chaux; l'autre moitié est engagée à l'état de P^2O^5 dans une combinaison organique. Les $3/5$ du calcium saturent l'acide phosphorique, les deux autres cinquièmes saturant l'acidité libre de la caséine.

Or, on sait depuis longtemps, que les solutions alcalines même diluées (soude à 1 p. 100 par exemple) enlèvent facilement le phosphore de la caséine. Cette facilité avait conduit à penser que son phosphore n'y est pas contenu à l'état de combinaison, mais qu'il est simplement adsorbé. Ce phosphore si faiblement lié fait-il partie ou non de sa molécule ? CL. RIMINGTON [167] a montré que, de la caséine déphosphorylée par action de la soude à 1 p. 100 à 37° pendant 24 heures, perd une partie de son azote à l'état d'azote aminé (arginine). De plus, elle ne coagule plus par la présure. Elle retrouve en grande partie cette propriété si on la recharge en acide phosphorique. D'après ces observations, il résulte que la caséine sur laquelle VAN SLYKE et BOSWORTH ont expérimenté, était déphosphorylée et par suite, dénaturée.

Nous avons préparé à plusieurs reprises de la caséine pure; nous donnerons plus loin la technique que nous avons suivie pour y doser le phosphore : sa teneur était de 0,810 p. 100.

Sous quel état le phosphore existe dans la caséine? Question délicate qui pose le problème encore loin d'être résolu de sa constitution. Nous allons tenter de l'esquisser à la lumière des travaux récents.

VI — CONSTITUTION

La caséine appartient au groupe général des protides ainsi défini par la Convention Internationale de Chimie Biologique : « Le terme protide désigne le groupe des substances qui comprend les acides aminés naturels et les substances qui donnent par hydrolyse un ou plusieurs de ces acides aminés ».

Cette définition nous fait penser que pour établir la constitution des protides, il faudra par l'analyse, isoler les acides aminés, puis par la synthèse, reconstituer l'édifice moléculaire. Ce sont les agents de dédoublement par hydrolyse (chimiques et diastasiques) qui ont conduit aux meilleurs résultats, dans le clivage de la molécule protéique. Les méthodes d'isolement des acides aminés ont été perfectionnées (FOREMAN [64], DAKIN [39], BUSTON et SCHRYVER [29]) au point que de nos jours, on connaît la presque totalité et la proportion des constituants d'un grand nombre de protéines, en particulier

ETUDE DES CONSTITUANTS AZOTES DU LAIT

de la caséine. Nous empruntons à E. SUTERMEISTER [200] un tableau donnant les pourcentages des différents acides aminés actuellement isolés de la caséine :

Glycine	0.45
Alanine	1.85
Valine	7.93
Leucine	7.92
Iso-leucine	1.43
Proline	8.70
Phénylalanine	3.88
Tyrosine	5.70
Acide glutamique.....	21.77
Acide aspartique.....	4.10
Acide hydroxyglutamique.....	10.50
Sérine	0.43
Hydroxy-proline	0.23
Tryptophane	1.70
Cystine	0.02
Arginine	4.84
Histidine	3.39
Lysine	7.72
Acide diaminotrihydroxydodécanoïque..	0.75
Acide-aminé contenant du soufre.....	0.40
Ammoniaque	1.61
Phosphore	0.85
Soufre	0.76
	96.93

Après avoir isolé les produits de l'hydrolyse complète des protéines, se pose le problème non moins compliqué d'établir leur mode de liaison dans l'édifice protéique : l'amidification en chaîne longue a permis à CURTIUS [38] et à E. FISCHER [59] de préparer de nombreux polypeptides présentant les plus grandes analogies avec les peptones, les albumoses, et même les albumines [100]. FISCHER [60] a reconnu que ce mode de liaison n'était pas le seul possible; il faut admettre l'existence soit de noyaux pipéraziniques, soit de noyaux où

l'oxygène des oxyaminoacides jouerait un rôle. E. ABDERHALDEN a apporté de nombreux arguments en faveur de cette hypothèse. A SIMÉON [188] en 1928, par application de la méthode de BLANCHETIÈRE, conclut à la présence de noyaux 2-5 dioxopipèraziniques dans la caséine.

Les ferments digestifs permettent une fragmentation ménagée des protéines facilitant ainsi l'étude de certaines liaisons qui passeraient inaperçues avec l'hydrolyse chimique. L'action de la pepsine et de la trypsine a fait l'objet de nombreux travaux qui ont eu surtout pour résultats de fixer la place du phosphore dans la molécule de caséine.

ACTION DE LA PEPSINE

En 1871, LUBAVIN [113] montre que, par action du suc gastrique sur la caséine, on obtient un précipité dont la teneur en phosphore varie avec la quantité de diastase et la durée de la digestion. (Résultats confirmés par KLINKENBERG [93] et MILROY [134].) Plusieurs chimistes constatent l'analogie de ce précipité avec la nucléine obtenue par digestion pepsique des nucléoprotéides. Cependant KOSSEL [96] en 1886, démontre que la similitude est apparente, le précipité ne contenant ni hydrate de carbone, ni base purique contrairement à la nucléine vraie (1). Aussi, afin d'éviter toute confusion, il propose de l'appeler paranucléine (1891) [97]. HAMMARSTEN en 1893, suggère le terme pseudonucléine. Jusqu'en 1893, date à laquelle SALKOWSKI commence ses expériences, on pensait que tout le phosphore de la caséine était contenu dans le précipité de paranucléine. C'est l'opinion de HOPPE SEYLER par exemple. SALKOWSKI et HAHN [179] montrent que, si l'on emploie suffisamment de pepsine, tout le précipité passe en solution (confirmé par KREHL et MATTHES [99], ALEXANDER [4], WILLDENOW [220]).

(1) A ce sujet, remarquons avec Blanchetière [22] « qu'entre les deux classes de composés, il existe une *différence fondamentale de constitution* : dans les acides nucléiniques, il est établi que la copulation se fait entre l'acide phosphorique et la fonction alcool primaire de la copule hydrocarbonée. Dans le cas des phosphoprotéines, l'acide paranucléique de Reh ne fournissant plus la réaction de Molisch, la copule hydrocarbonée est nécessairement hors de cause, la copulation doit donc se faire sur les oxyacides ».

La grande variabilité de la teneur en phosphore de la paranucléine (1) amène ROBERTSON [171, 172] à étudier la question. Il conclut que la paranucléine est probablement un mélange de deux substances : l'une, à haute teneur en phosphore, l'autre, à bien des égards semblables à la première, mais à faible teneur en phosphore : une paranucléine contenant 4.175 p. 100 de P^2O^5 , par digestion avec de l'eau de chaux à 40° pendant 12 heures, donne une petite quantité de substance à propriétés identiques à celles de la paranucléine, mais contenant seulement 1.4 à 1.6 p. 100 de P^2O^5 . ROBERTSON l'appelle paranucléine A. Par action à 40° d'une solution concentrée de pepsine sur une solution concentrée acide des produits de la digestion pepsique (ne contenant par conséquent ni caséine, ni paracaséine), on peut obtenir une substance qui, par ses propriétés et par sa teneur en phosphore, s'identifie avec la paranucléine A.

De nombreux essais en vue d'isoler un corps organique phosphoré défini de la digestion pepsique de la caséine furent en vain tentés par SALKOWSKI [178], REH [165] (acide paranucléique), DIETRICH [47] (acide caséo-phosphorique).

ACTION DE LA TRYPSINE

Elle a été beaucoup moins étudiée que celle de la pepsine. SEBELIEN le premier, montre que par digestion trypsique, toute la caséine est solubilisée; donc, pas de paranucléine. BIFFI [21] constate qu'une partie seulement (27 p. 100) du phosphore ainsi solubilisé peut être précipitée par une mixture magnésienne, le quantum précipitable variant d'ailleurs avec la concentration de la diastase et la durée de la digestion. PLIMMER et BAYLISS [157] vérifient ces résultats et observent que la solubilisation du phosphore est rapide, tandis que la production d'acide phosphorique est lente : une solution de soude à 1 p. 100 sépare à l'état d'acide phosphorique 50 p. 100 du phosphore contenu dans le liquide en 40 heures à 38°. Postérieurement, PLIMMER [156] montre que tout le phosphore de la caséine peut passer à l'état d'acide phosphorique.

(1) Dans les mémoires, cette teneur allait de 0,88 à 6,86 p. 100.

RIMINGTON et KAY [169] sont parvenus à isoler une substance diffusible contenant plus de 50 p. 100 de phosphore de la caséine initiale. Elle possède de fortes propriétés acides, donne des sels insolubles avec les métaux lourds (seul le sel de Baryum est soluble) contenant chacun 9 atomes de métal. Elle répond à la formule $C^{37} H^{62} O^{33} N^9 P^3 [\alpha]_{5461}^{15^\circ} = -80^\circ 53$. Par ses réactions chimiques, elle s'apparente avec les peptones d'où son nom de « phospho-peptone ». Par digestion trypsique, la moitié de son phosphore est libérée en 20 heures, le reste est ensuite hydrolysé lentement, la transformation est complète en 6 jours. La phosphatase des os (du rat) hydrolyse seulement 67 p. 100 du phosphore organique en phosphore inorganique; tandis que la phosphatase des reins (du lapin) provoque l'hydrolyse complète (100 p. 100). Dans cette phosphopeptone, il y a 9 fonctions alcool pour 3 molécules d'acide phosphorique. Ce dernier éthérifie les fonctions alcool des acides aminés, soit par une, soit par deux de ses fonctions acides.

Cette phosphopeptone semble se rapprocher beaucoup des lactotyrynes isolées par POSTERNAK [161] de la digestion trypsique de la caséine. Ces lactotyrynes au nombre de trois, α , β , γ , correspondent respectivement aux formules :

	Poids			
	moléculaire	P %	N %	
$C^{64} H^{111} N^{15} O^{43} P^4$	—	—	—	1902 — 6.51 — 11.03
$C^{67} H^{116} N^{16} O^{44} P^4$	—	—	—	1972 — 6.29 — 11.36
$C^{72} H^{124} N^{18} O^{47} P^4$	—	—	—	2116 — 5.86 — 11.91

« Elles sont solubles dans l'eau, γ moins que α et β . Leurs solutions sont très acides à l'hélianthine et au tournesol. Elles forment des sels alcalins et alcalino-terreux solubles dans l'eau. Elles sont fortement lévogyres. Elles donnent une belle réaction rose de biuret et pas de réactions de Millon, de Molisch et xanthoprotéique.

Les résultats de l'hydrolyse de la lactotyryne α conduisent Posternak à exprimer sa décomposition par l'équation :



Les 15 molécules d'acide aminés se trouvent dans la lactotyline α en liaison peptidique, car un polypeptide formé dans ces conditions de 11 acides monobasiques et de 4 bibasiques, possède 5 carboxyles libres qui, ensemble avec les 4 restes phosphoriques bibasiques, doivent présenter à la titration, en présence de la phtaléine du phénol, 12 acidités. Trouvé : 11,6.

Etant donnée cette structure du polypeptide, les 4 acides phosphoriques ne peuvent être fixés que sur les oxhydriles des sérines. De cette étude, découle cette notion nouvelle que *le noyau phosphoré de la caséine de lait est formé de 4 acides sérine-phosphoriques* ».

Là, se bornent à peu près nos connaissances sur la constitution de la caséine.

B) La Lactalbumine

C'est une protéine dont l'existence dans le lait n'est plus contestée de nos jours. En général, on en trouve 4 à 5 g. par litre, 2 g. 4 seulement d'après OSBORNE. Elle possède les propriétés des albumines sériques: A froid, elle n'est pas coagulée par l'acide acétique; elle l'est par la chaleur en milieu salin et légèrement acide.

Pour montrer son existence, il suffit de saturer du lait cru à la température ordinaire avec une bouillie cristalline de $\text{SO}^{\circ}\text{Mg}$: la caséine et la globuline précipitent. Le filtrat légèrement acidifié par l'acide acétique est porté à l'ébullition. La lactalbumine floccule rapidement. Son pouvoir rotatoire spécifique est très différent de celui de la caséine. Il oscille suivant les auteurs entre -30° et -35° . PIETTRE [154] lui attribue une valeur plus élevée $-41^{\circ}23$. Elle ne contient pas de phosphore. VAN SLYKE et BOSWORTH cependant en ont trouvé des traces; mais d'après PORCHER [160], leurs analyses ont porté sur un produit insuffisamment purifié. Son hydrolyse ne conduit pas aux mêmes acides aminés que ceux de la caséine et, pour ceux qui sont semblables, les proportions relatives sont différentes.

BAUER et ENGEL [11] semblent l'avoir identifiée avec la sérum-albumine.

Sa composition élémentaire serait la suivante :

	OSBORNE et WAKEMAN [143]	SEBELIEN [186]
C.....	52.51	52.19
H.....	7.10	7.18
N.....	15.43	15.77
S.....	1.92	1.73
P.....	traces	0.16

C) La Lactoglobuline

C'est une protéine peu abondante dans le lait de vache. PICHON-VENDEUIL en trouve 2 à 3 g. par litre, OSBORNE 0 g. 20 seulement. Elle possède les propriétés des globulines : coagulable par la chaleur, précipitable par le sulfate de magnésium à saturation. Pour la rechercher, il suffit de précipiter la caséine par l'acide acétique. Après filtration, le lactosérum est soigneusement neutralisé, puis traité par une pâte cristalline de SO'Mg jusqu'à saturation. La globuline se sépare en flocons légers. Sa solubilité dans l'eau pure est $S = 0$ g. 07 par litre. COHN et HENDRY [33].

Son pouvoir rotatoire est de $-31^{\circ}12$ en solution sodique (PIETTRE). Son point isoélectrique est à $pH = 5,4$.

OSBORNE et WAKEMAN lui attribuent la composition suivante :

C	51.88 p. 100
H	6.96 »
N	15.44 »
S	0.86 »
P	0.24 »

Elle semble identique à la globuline du sérum sanguin. Plus que l'albumine, elle se rapproche de la caséine; celle-ci ne serait qu'« une globuline sur laquelle sont venues se fixer par éthérification des molécules d'acide phosphorique » PORCHER [160], CROWTHER et RAISTRICK [37].

« Tandis que la caséine existe sous la forme saline en affectant l'aspect de micelles d'assez grosses dimensions, l'albumine et la globuline sont, en raison de la petitesse de leurs particu-

les, considérées comme colloïdes moléculaires. Et ce sont les dimensions extrêmement réduites des particules dispersées de l'albumine, de la globuline qui leur donnent un caractère protecteur vis-à-vis du caséinate. PORCHER.

« Albumine et globuline sont des colloïdes réversibles stables qui protègent les colloïdes à plus gros micelles : caséinate et phosphates instables. » ALEXANDER et BULLOWA [5].

En dehors de la caséine, de l'albumine et de la globuline, OSBORNE et WAKEMAN [143] prétendent avoir isolé des liquides alcooliques de lavage de la caséine une quatrième protéine de composition suivante :

	<i>Protéine soluble dans l'alcool</i>	<i>Caséine</i>
C.....	54.91	53.11
H.....	7.17	7.05
N.....	15.71	15.65
S.....	0.95	0.82
P.....	0.08	0.82

Cette protéine peu soluble dans l'eau, l'est beaucoup dans une solution diluée d'acide acétique. Chauffée, cette solution devient opalescente à 45°, blanchit comme du lait à 90°, mais ne floccule pas, même à l'ébullition. Le ferrocyanure de potassium y détermine une coagulation abondante. Cette protéine ne doit pas être confondue avec les protéoses : sa solubilité dans l'alcool fort la distingue de tout autre type isolé jusqu'à des tissus ou produits animaux.

D) L'azote résiduel

La partie non protéique du lait qui représente en moyenne 3 à 6 p. 100 de l'azote total est constituée par :

Des Acides aminés, 1 g. par litre. — PICHON-VENDEUIL [153].

De l'Urée, 0 g. 25 à 0 g. 30 par litre. — LEFORT [103], KÖENIG [95], MORIMOTO [136].

De la Xanthine et de l'Hypoxanthine. — SCHMIDT-MUHLHEIM.

De la Créatine, 0 g. 020 à 0 g. 025 — DENIS et MINOT [44].

De la Créatinine préformée, 0 g. 010 à 0 g. 015 — COMMAILLE [34].

De l'Acide Urique, 0 g. 015 — DENIS et MINOT [44].

De la Guanine et de l'Adénine (au minimum 0 g. 005 d'adénine et 0 g. 010 de guanine par litre de lait. — G. VÆGTLIN et C. P. SHERWIN [217].

PICHON-VENDEUIL a particulièrement étudié les amino-acides rencontrés dans le lait à l'état libre, il trouve :

	Dans le mélange acido-aminé	Dans le lait
Glycocolle	65.25 p. 100.....	0.0652 p. 100
Tyrosine	9 »	0.0090 »
Leucine	9.18 »	0.0092 »
Ac. aspartique...	1.98 »	0.0020 »
Ac. glutamique...	5.37 »	0.0054 »

Le glycocolle, fait curieux, forme les 2/3 du total des amino-acides. Or, il ne fait pas partie de la molécule de la caséine et de la lactalbumine. La lactoglobuline en contient bien, mais son hydrolyse en fournirait une moyenne de 0 g. 10 par litre.

PICHON-VENDEUIL [153] conclut qu'« il y a une notable différence dans la signification de la présence des amino-acides du lait ». Les uns, tels la leucine, l'acide aspartique et glutamique, la tyrosine ne paraissent pas jouer un rôle primordial et semblent constituer les résidus d'une synthèse de la nature. Le glycocolle, au contraire, affirme son utilité puisque, malgré son absence relative dans les différents constituants protéiques du lait, il est l'acide-amino de beaucoup le plus abondant.

DEUXIÈME PARTIE

Nous avons, dans les chapitres précédents, défini la composition azotée du lait ainsi que la nature de ses différents éléments. Voyons maintenant les procédés d'analyse qui permettent leur séparation.

Pour cette étude, nous adoptons la marche suivante :

- 1° *Dosage en bloc des protéines.*
- 2° *Dosage de la caséine.*
- 3° *Méthodes de préparation de la caséine pure.*
- 4° *Séparation de la lactalbumine.*

CHAPITRE I

Dosage en bloc des Protéines

Le dosage de la matière albuminoïde du lait s'effectue de deux façons :

- 1° par différence;
- 2° directement.

1° Par différence.

Cette méthode très suivie consiste à retrancher du poids de l'extract la somme des poids de lactose, de beurre et de cendres obtenus par dosages directs. On conçoit facilement tout ce que cette technique présente de défectueux et de conventionnel :

a) le poids de l'extract varie pour un même lait avec la durée du chauffage, la dimension de la capsule, la nature des parois agissant comme agent catalysant, la quantité de lait, l'état hygrométrique, la forme, la dimension du bain-marie, l'intensité du chauffage.

Aussi, les conditions officielles de détermination de l'extract sont-elles très précises : Evaporer 10 cm³ de lait dans une capsule en platine, à fond plat, de 70 mm. de diamètre et 20 mm. de hauteur. Chauffer pendant 7 heures sur un bain-marie fermé par un couvercle de cuivre dans lequel sont ménagés des alvéoles de la dimension des capsules. Ces alvéoles plongent dans l'eau bouillante du bain-marie et le dégagement de la vapeur de celui-ci se fait par une cheminée latérale. La proportion d'extract est calculée par litre de lait.

b) **ESBACH** estime que dans l'extrait à 100° le lactose est totalement déshydraté. Il faut donc utiliser dans le calcul le poids de lactose anhydre. D'autres chimistes négligent cette observation et emploient le poids de lactose hydraté, ce qui diminue la matière albuminoïde d'environ 2 g. 5 par litre (le lactose hydraté contenant 5 p. 100 d'eau).

VILLIERS et **COLLIN** [215] ont de plus observé « que par suite de très légères différences de température pouvant exister à la surface du bain-marie, le poids du résidu de l'évaporation d'une solution de sucre de lait peut être, après huit heures, encore supérieur au poids du sucre de lait hydraté, ou que ce sucre peut, au contraire, avoir perdu une partie plus ou moins grande de son eau d'hydratation. Si l'on continue à chauffer jusqu'à poids constant, lorsque la dessiccation a été relativement rapide, le poids fixe du résidu correspond exactement au sucre de lait anhydre; lorsqu'elle s'est faite plus lentement, la diminution de poids se poursuit encore au-delà de cette limite, c'est-à-dire que c'est à la température la moins élevée que la perte de poids définitive est la plus grande. Ce fait paradoxal tient probablement à une action de l'eau, déterminant un dédoublement partiel du sucre de lait en glucoses plus altérables, ainsi que l'indique la coloration jaune ou brune que prend le résidu lorsque le poids définitif est inférieur à celui du sucre de lait anhydre ».

On voit combien il est défectueux de déterminer l'extrait du lait à chaud. Aussi conseillent-ils de déterminer l'extrait dans le vide à la température ordinaire; le sucre de lait n'est pas déshydraté et les résultats obtenus sont plus fixes et tout à fait comparables entr'eux.

c) Pour un même lait, l'écémage et le mouillage faussent le poids véritable de l'extrait.

d) **ROUX** [176], après **MARCHAND** a fortement insisté sur l'importance du dosage de l'acidité du lait. Si l'on opère, surtout en été, sur un lait traité depuis plusieurs heures, l'altération est commencée et une certaine quantité de lactose est déjà transformée en acide lactique. Si l'on n'en tient pas compte, le poids de cet acide s'ajoutera à celui de la matière albu-

minoïde, ce qui peut amener une erreur par excès, susceptible d'atteindre 4 à 5 g. par litre sans que le lait soit coagulé.

e) Le lait, d'après VILLIERS et COLLIN, « contient à l'état de combinaisons alcalines des produits distincts des matières albuminoïdes et qui sont détruits pendant la calcination, de sorte qu'en réalité, le poids calculé par différence doit être supérieur à celui qui existe réellement dans le lait ».

Sans parler des erreurs toujours possibles et même faciles dans le dosage des divers éléments du lait, ces observations nous conduisent à rejeter cette technique de dosage de la matière albuminoïde.

2° Directement.

Dans les méthodes directes de dosage, on précipite les protéines par un réactif approprié dans des conditions bien définies. Plusieurs cas peuvent se présenter :

1° Le réactif précipite les protéines sans se combiner avec elles. Il suffit alors de se débarrasser de l'excès de réactif par lavages et de peser la matière albuminoïde.

2° Le réactif donne avec les protéines une combinaison insoluble.

a) Lorsque cette dernière admet une composition définie et constante, on détermine son poids et de là celui des protéines qui y sont engagées. On peut aussi doser l'excès du réactif qui n'est pas entré en combinaison. La méthode gagne en rapidité mais perd de sa précision.

b) Lorsque le complexe formé contient bien toutes les protéines mais n'a pas une composition définie et constante, on peut alors, s'il est instable, en séparer le réactif et peser la matière albuminoïde ou doser l'azote par la méthode de KJELDAHL et recourir à un coefficient de conversion. On peut encore doser l'azote total et l'azote résiduel; par différence, on a l'azote protéique.

Nombreux sont les réactifs proposés pour la désalbumination du lait. Dans cet exposé historique, nous n'étudierons que les plus importants :

- 1° *L'alcool;*
- 2° *Les sels de métaux lourds;*
- 3° *L'acide tannique;*
- 4° *L'acide trichloracétique;*
- 5° *L'acide métaphosphorique;*
- 6° *L'asaprol;*
- 7° *L'acide phosphotungstique.*

I. — ALCOOL

L'alcool précipite quantitativement les protéines de leurs solutions, à condition que celles-ci ne soient pas trop pauvres en électrolytes. Il a été utilisé depuis très longtemps, comme désalbuminant de la plupart des liquides biologiques. Nous retiendrons en ce qui nous concerne, le procédé MERCIER, appliqué au lait de femme, dans lequel son action est combinée à celle de l'acide acétique :

« Dans 100 cm³ d'alcool à 96°, additionné de deux gouttes seulement d'acide acétique, verser 10 cm³ de lait. Après quelques heures de repos, recevoir le précipité sur un filtre taré. Le laver d'abord avec un mélange à parties égales d'éther et d'alcool à 96°. Puis finalement avec de l'éther, jusqu'à ce que quelques gouttes de ce dernier, évaporées dans un verre de montre, ne laissent plus de résidu, — Sécher alors le filtre à 100° jusqu'à poids constant et peser. On a ainsi le poids de protéines totales contenues dans 10 cm³ de lait. — Rapporter au litre » GRIMBERT [73].

MALENFANT [118] a publié une technique de précipitation de la caséine du lait de vache au moyen de l'alcool à 65° acidifié avec un millième environ d'acide acétique cristallisable. Le précipité est lavé avec de l'alcool à 50°. Il est dégraissé à l'aide d'alcool à 95°, d'acétone, puis d'éther, ces réactifs étant employés bouillants. Il est séché à l'étuve à 100° pendant sept heures, puis pesé après refroidissement dans un exsiccateur. Le poids trouvé représente celui de la caséine accompagnée

des sels insolubles qu'elle retient. Pour avoir le poids de caséine pure, il suffit de le multiplier par le coefficient 0.925.

En fait dans ce procédé, de la lactalbumine et de la lactoglobuline sont précipitées en même temps que la caséine. C'est pourquoi nous l'indiquons dans le dosage en bloc des protéines du lait.

II. — SELS DE METAUX LOURDS

RITTHAUSEN [170] recommande, pour le dosage des constituants azotés non protéiques du lait, de précipiter les protéines par l'hydrate de cuivre. Voici sa méthode :

Mêler dans l'ordre 10 cm³ de lait, 200 cm³ d'eau et 5 cm³ du réactif suivant :

SO ₄ Cu, 5H ₂ O	63 g. 50
Eau	q. s. pour 1.000 cm ³

Agiter, neutraliser à très peu près avec de la lessive de soude diluée (à 10 g. 2 par litre) en présence de phénol-phtaléine. Les matières protéiques précipitent. Recueillir le précipité. Le laver à l'éther pour éliminer les graisses. Le sécher à l'étuve à 100°-125°. Peser, calciner, peser à nouveau. La différence donne le poids des matières protéiques contenues dans la prise d'essai. Si la neutralisation est exacte, il n'y a plus de cuivre en solution et la méthode est parfaite. Il faut éviter le moindre excès de soude qui suffit pour solubiliser une quantité souvent appréciable de matière albuminoïde. Par contre, un léger excès d'acide ne nuit pas.

TARASZKEWICZ [120] avait proposé auparavant de doser volumétriquement les matières albuminoïdes du lait en les précipitant par une solution titrée d'acétate de cuivre. Mais RITTHAUSEN rejette ce procédé. La composition du complexe formé n'est pas constante. Il est nécessaire d'utiliser la méthode pondérale.

STENBERG [194] a vérifié que l'hydrate d'oxyde de cuivre qui se précipite avec les matières albuminoïdes ne perd son eau de constitution qu'au rouge et jamais à la température de 100°. Cette eau est donc appelée à être comptée comme matière protéique. La méthode ne donne de bons résultats que si la

prise d'essai contient au minimum 0 g. 60 de protéine. De plus, le rapport de l'oxyde de cuivre aux protéines doit varier entre les limites suivantes : 1 p. 3 — 1 p. 3,5. Il faut donc au préalable faire un dosage approximatif.

SEBELIEN conseille de doser l'azote du précipité par la méthode de KJELDAHL et de le convertir par le calcul en albumine. L'erreur signalée par STENBERG est ainsi évitée et le dégraissage à l'éther devient inutile. Ainsi modifiée, la méthode est applicable à des dosages en série.

MUNK [138], pour éviter le temps délicat de la neutralisation, combine la méthode de RITTHAUSEN avec celle de STUTZER [199]. Ce dernier fait usage d'une bouillie titrée d'hydrate d'oxyde de cuivre préparée de la manière suivante :

Dissoudre 100 g. de sulfate de cuivre dans 5 litres d'eau additionnée de 2 g. 5 de glycérine. Verser de la lessive de soude étendue jusqu'à réaction alcaline. L'hydrate d'oxyde de cuivre précipite. Filtrer. Laver à l'eau glycinée à 5 0/00 pour éliminer l'excès d'alcali. Triturer le précipité au mortier avec de l'eau glycinée à 10 p. 100 jusqu'à obtention d'une masse homogène, aspirable à la pipette. Conserver cette suspension dans des flacons bouchés à l'obscurité. Doser $\text{Cu}(\text{OH})^2$ par évaporation et calcination d'un volume connu.

Dans son procédé MUNK ajoute de l'alun; de cette manière les phosphates alcalins du lait ne sont pas transformés en phosphate de cuivre et alcali libre susceptible de dissoudre les matières protéiques :

Mesurer 10 cm³ de lait, dans un verre de bohème. Diluer avec 100 cm³ d'eau distillée. Ajouter 1 à 2 cm³ de solution d'alun. Faire bouillir. Verser alors 5 cm³ de la suspension de STUTZER. Maintenir l'ébullition pendant quelques minutes. Le précipité se dépose rapidement. Filtrer aussitôt. Laver à l'eau chaude. Doser l'azote du précipité par la méthode de KJELDAHL.

Dans la pratique, d'après G. SIMON [190], il est difficile d'éviter des projections à l'ébullition. En dehors de cette critique, la méthode est parfaite et jamais dans le filtrat on n'obtient de louche par le réactif tannique.

D'autres sels de métaux lourds ont été utilisés comme désalbuminants : les sels de plomb par exemple, et notamment

l'acétate. STORCH [197] précipite les substances albuminoïdes par l'alcool et complète la précipitation en ajoutant de l'acétate basique de plomb. SEBELIEN [187] s'est assuré que par ce moyen la désalbumination est incomplète; en conséquence, il rejette cette méthode.

Les sels de mercure ont joui d'une très grande vogue. DENIGÈS [43] a indiqué un procédé volumétrique permettant de doser rapidement l'ensemble des albuminoïdes (improprement caséine totale). Il repose :

1° Sur l'insolubilisation par l'iodure mercurico-potassique en milieu légèrement acétique des albuminoïdes du lait, entraînant avec eux en combinaison, une partie du mercure du réactif,

2° Sur le dosage du mercure résiduel par cyano-argentimétrie.

3° Sur l'emploi d'un tableau de correspondance établi expérimentalement par l'auteur entre le mercure précipité et les albuminoïdes entrés en combinaison avec lui (1).

POLONOVSKI et LESPAGNOL [158] ont récemment indiqué une technique de dosage de la caséine (2) dans le lait de femme fondée sur le même principe que celle de Denigès. Mais au lieu d'utiliser la cyano-argentimétrie pour doser le mercure resté en solution, ils ont recours à sa réduction à l'état métallique, puis à son dosage par la méthode de BAUDOUIN [10]. L'agent de réduction choisi est le lactose du lait lui-même.

Pour séparer le mercure précipité, les auteurs emploient l'artifice (utilisé dans le dosage du sucre par la méthode de FONTÈS et THIVOLLE) [63] qui consiste à englober le pré-

(1) Cette méthode a permis de montrer en passant que les caséines des différents laits, même les plus dissemblables en apparence, se comportent d'une manière absolument identique vis-à-vis de l'iodure mercurico-potassique, ce qui indique leur très grande analogie, sinon leur identité complète.

(2) Le terme caséine est impropre car c'est « l'ensemble des protéines » que l'on dose par cette méthode. Or, dans le lait de femme la proportion de caséine atteint seulement 50 à 60 p. 100 des protéines totales.

cipité de Hg dans du carbonate de magnésie produit au sein de la liqueur elle-même par addition de solutions de CO^3Na^2 et de SO^4Mg .

IONESCU-MATTU et BORDEIANO [90] ont trouvé un réactif (HgCl^2 5 gr. + acétone 100 cm^3) qui précipite intégralement les protéines du lait. Les graisses restent en solution dans l'acétone qui surnage le précipité. On fait usage d'une éprouvette *ad hoc* qui permet la mesure exacte du volume protéo-mercure; de ce volume, on déduit la quantité de protéines pour cent. Cette technique paraît d'une précision assez relative et on doit lui préférer la méthode de DENIGÈS qui convient très bien pour des dosages en série.

Enfin, certains sels de zinc et d'urane ont été proposés comme désalbuminants; aucune étude sérieuse ne sanctionnant leur valeur, nous les laisserons de côté.

III. — ACIDE TANNIQUE

L'acide tannique précipite complètement les protéines si l'on observe certaines précautions. ALMEN [6] a proposé le réactif suivant :

Alcool à 40-45°.....	190 cm^3
Acide acétique à 25 p. 100.....	8 cm^3
Tanin	4 gr.

G. SIMON [190] l'utilise comme suit :

Verser dans un verre de bohème 10 cm^3 de lait, 100 cm^3 d'eau distillée, puis 15 cm^3 de réactif. Agiter. Laisser déposer quelques heures. Décanter sur un filtre. Laver à l'eau froide. Peser (la méthode volumétrique ne vaut rien avec ce réactif).

Le filtrat même concentré ne précipite ni ne trouble par les réactifs les plus sûrs des matières protéiques (acide phosphotungstique). SEBELIEN, opérant sur des protéines pures (caséine, lactalbumine, ovalbumine), a obtenu des filtrats tanniques absolument exempts d'azote.

LIBORIUS [106] prétend que l'albumine se combine avec le tanin dans un rapport constant (60 p. 100 du complexe total).

Telle n'est pas l'opinion de SEBELIEN qui conseille de doser l'azote du précipité par la méthode de KJELDAHL. LIEBERMANN [107] montre qu'ainsi, on évite de considérer des sels comme matière albuminoïde.

GIRGENSOHN [70] et TARASZKEWICZ [201] ont proposé d'éliminer le tanin du complexe par un lavage à l'éther de pétrole, suivi d'un lavage à l'alcool à 90° bouillant; ainsi on obtient des albumines pures qu'on pèse.

Le tapin est un réactif sûr et très exact de la précipitation en bloc des protéines du lait. Son action semble ne pas porter sur leurs produits de dégradation. Les peptones seraient précipitées par une quantité insuffisante du réactif, mais redissoutes par un excès.

IV. — ACIDE TRICHLORACETIQUE

OBERMAYER [142] a montré qu'on peut précipiter totalement les protéines du lait avec une solution concentrée d'acide trichloracétique (*acide 2 parties, eau 1 partie*).

Recueillir le précipité sur un filtre. Laver à l'eau acidulée par le réactif. Traiter par l'alcool-éther. Sécher. Peser.

SIMON [190] a étudié ce procédé et recommande de ne jamais diluer le lait. La solution d'acide au 1/3 lui semble suffisante pour assurer la précipitation. En tous cas, quelles que soient les conditions d'expérience, le filtrat trichloracétique donne toujours un précipité ou une opalescence par le réactif d'ALMEN ou l'acide phosphotungstique.

ROUX [176] obtient la précipitation intégrale des protéines en sursaturant par l'acide trichloracétique, non le lait, mais la solution aqueuse ammoniacale qui s'écoule dans le dosage du beurre par le procédé ADAM. Les eaux mères ne précipitent ni même ne louchissent par les réactifs d'ESBACH et de TANNER. L'acide trichloracétique est d'un emploi très courant dans les laboratoires pour la désalbumination du sérum sanguin. A la concentration de 20 p. 100, employé suivant la technique de MOOG [135], « il ne précipite pas les polypeptides pouvant exister dans le sérum et son action hydrolysante est nulle » (CRISTOL) [36].

Il ne peut s'appliquer à la désalbumination du lait de femme dont la caséine est très soluble dans un excès de cet acide.

V. — ACIDE MÉTAPHOSPHORIQUE

GRIGG [71] et HINDENLANG [83] ont, les premiers, signalé que les albumines sont coagulées par l'acide métaphosphorique; cette propriété n'est pas partagée par l'acide ortho.

DENIGÈS [42], en vue du dosage du lactose, a utilisé ce réactif pour insolubiliser les albuminoïdes du lait :

« Mettre dans un matras jaugé de 100 cm³, 10 cm³ de lait, 3 cm³ d'une solution de métaphosphate de soude à 5 p. 100 (1), 60 à 70 cm³ d'eau, et agiter. Puis ajouter 0 cm³ 3 d'acide acétique, ou mieux 0 cm³ 5 d'acide chlorhydrique (qu'il faut uniquement employer avec les laits de femme, d'ânesse ou de jument). Compléter le volume à 100 cm³ avec de l'eau. Agiter. Filtrer. Les premières gouttes sont généralement louches, surtout avec le lait de femme. Cependant, elles se clarifient assez vite et lorsqu'elles sont tout à fait limpides, recueillir le filtratum dans une éprouvette. On obtient ainsi à froid, même avec le lait de femme si difficile à coaguler par les méthodes ordinaires, un petit lait d'une limpidité parfaite. »

G. SIMON fait remarquer qu'avec l'acide métaphosphorique comme désalbuminant, on obtient toujours dans le filtrat un précipité par l'acide tannique. On peut même doser l'azote dans ce précipité.

VI. — ASAPRÔL

(*Naphtol Monosulfonate de Calcium*)

A. BONJARD et E. BAIER [23] indiquent pour précipiter les protéines, le réactif suivant :

Asaprôl	15 g.	
Acide citrique pulvérisé.....	15 g.	
Eau	500 g.	Filtrer.

(1) Fondre le sel du commerce, ou chauffer dans une capsule de platine du sel de phosphore, d'abord jusqu'au départ de l'eau et de l'ammoniac, puis au chalumeau jusqu'à fusion ignée tranquille. Couler par perles sur une plaque d'acier et conserver en flacons bien bouchés. Pour l'usage, en dissoudre à froid 5 g. dans 100 cm³ d'eau en agitant fréquemment; la dissolution est lente.

Dans un ballon jaugé de 100 cm³, verser 10 cm³ de lait, puis 15 cm³ de réactif. Compléter avec de l'eau. Agiter. Chauffer à 60°. Filtrer.

Comme précédemment, le filtrat précipite par le tanin.

VII. — ACIDE PHOSPHOTUNGSTIQUE

C'est un réactif extrêmement sensible des matières protéiques (sensibilité : 1/100.000 à 1/200.000). En présence d'acide minéral, il est couramment employé pour désalbuminer la plupart des liquides biologiques.

Pour le préparer, dissoudre une partie d'acide phosphotungstique dans 5 parties de solution d'acide sulfurique à 2 p. 100 (formule de SEBELIEN).

Pour l'emploi, G. SIMON [190] indique de diluer 10 cm³ de lait avec 10 cm³ d'eau. Ajouter 2 cm³ de réactif phosphotungstique. Agiter. Porter à la glacière. Le précipité se dépose en quelques heures. Filtrer. Laver jusqu'à ce que les eaux de lavage ne contiennent plus d'acide sulfurique.

Le filtrat reste clair par addition d'acide tannique et phosphotungstique. SIMON compare les désalbuminations tannique et phosphotungstique; il dose l'azote résiduel dans les filtrats et, sauf de rares exceptions, trouve des résultats identiques. Relevons quelques chiffres dans son mémoire :

N RESTANT 0/00 en milligrammes

DESALBUMINATION TANNIQUE	DESALBUMINATION PHOSPHOTUNGSTIQUE
331	331
332	332
372	372
288	269

Les dosages de l'azote dans les précipités obtenus par action sur le même lait, du tanin et de l'acide phosphotungstique révèlent une différence moyenne de 0 g. 028. La diffé-

rence extrême constatée sur de très nombreux essais est de 0 g. 068.

W. GRIMMER, C. KURTENACKER et R. BERG [72] ont comparativement désalbuminé par les acides tannique et phosphotungstique des lactosérums provenant de la séparation de la caséine par la méthode à l'alun de SCHLOSSMANN.

Comme le remarque SIMON, les chiffres d'azote résiduel sont très comparables, mais ils ne sont pas identiques. On relève toujours une différence montrant que la désalbumination phosphotungstique entraîne plus d'azote que la désalbumination tannique. Voici quelques chiffres donnés par ces auteurs :

N RESTANT 0/00 en milligrammes	
<i>Désalbumination de lactosérums par :</i>	
L'ACIDE TANNIQUE	L'ACIDE PHOSPHOTUNGSTIQUE
290	280
280	270
290	270
290	280

Nous avons comparé les deux techniques; nos résultats confirment ceux de GRIMMER et de ses collaborateurs et non ceux de SIMON. Nous nous sommes pourtant placés dans les conditions de Simon opérant sur le lait même et non sur le lactosérum. Donnons quelques-uns de nos résultats.

N RESTANT 0/00 en milligrammes	
DÉSALBUMINATION TANNIQUE	DÉSALBUMINATION PHOSPHOTUNGSTIQUE
270	250
340	315
301	290
408	360

Il y a toujours entre les deux désalbuminations un écart, d'ailleurs variable, montrant bien le domaine d'action plus large de l'acide phosphotungstique. Ce dernier, en plus des protéines, précipite leurs produits d'hydrolyse : peptones, albumoses et divers composés peptidiques.

Le lait frais contient-il des peptones et des albumoses préformées? Les avis sont très partagés. SCHMIDT-MUHLHEIM [182] en a trouvé de 0.08 à 0.19 p. 100 (1). SEBELIEN au contraire, déclare n'avoir jamais pu en déceler, même des traces. En tous cas, le lait qui, par séjour à l'air a subi la fermentation lactique spontanée en contient par hydrolyse acide de ces protéines.

Ainsi, les écarts observés et leur variabilité trouveraient explication dans la précipitation par l'acide phosphotungstique, d'une partie plus ou moins grande de cette fraction comprise entre les albumines vraies et les acides aminés. Il ne serait pas étonnant que des phénomènes d'adsorption par le précipité albuminoïdique, viennent compliquer cette précipitation.

VIII. — METHODES AU FORMOL

Nous allons donner un procédé de dosage des protéines totales indiqué en 1906 par TRILLAT et SAUTON [206], reposant sur la propriété que possède la formaldéhyde d'insolubiliser les matières albuminoïdes :

« 5 cm³ de lait sont étendus à 25 cm³, par de l'eau distillée, dans un verre de bohème de 100 cm³; on porte à l'ébullition pendant 5 minutes; le liquide est ensuite additionné de 5 gouttes de formol du commerce. Il est de toute importance d'observer que cette addition de formol doit avoir lieu *après ébullition*; sans cette précaution, une partie de la matière albuminoïde (celle précisément qui est désignée sous le nom d'albumine du lait) échapperait à cette précipitation.

« On laisse bouillir encore 2 à 3 minutes; on abandonne au repos pendant 5 minutes, puis on traite le liquide par 5 cm³ d'acide acétique à 1 p. 100; on agite au moyen d'une ba-

(1) Pour Dogiel le précipité pris par Schmidt-Muhlheim pour de la peptone serait tout simplement un reste d'albumine non précipitée.

guette de verre. Il se forme un précipité pulvérulent qu'on recueille sur un filtre taré de petites dimensions. On lave à l'eau distillée. Les eaux du filtrat ne doivent donner aucun précipité avec les réactifs les plus sensibles des matières albuminoïdes. On introduit le filtre et son contenu dans un appareil à épuisement et on extrait la matière grasse par l'acétone qui permet un dégraissage beaucoup plus rapide que l'éther; on dessèche à l'étuve à 75-80° et on pèse. Le précipité obtenu est blanc, il ne doit pas adhérer au papier, ni laisser de tache grasseuse par transparence. »

L'opération totale s'effectue en moins de 2 heures et il est facile de conduire simultanément plusieurs dosages. Les auteurs, pour contrôler leur méthode, se sont assurés que toute la matière albuminoïde était ainsi séparée, qu'elle possédait la composition élémentaire de la caséine et que la formaldéhyde ne faisait pas varier son poids.

Le procédé publié par BARRAL [9] pour le dosage des protéines totales du lait de femme repose aussi sur l'insolubilisation des matières albuminoïdes par le formol.

Dans un tube de centrifugeur, verser 25 cm³ d'alcool à 65° contenant par litre 1 cm³ d'acide acétique et 20 cm³ de formol à 40 p. 100; chauffer le tube vers 70-80° au bain-marie. Retirer le tube et verser dans le liquide 10 cm³ de lait exactement mesurés, en évitant de remuer le mélange. Refroidir le liquide en plongeant la partie inférieure dans de l'eau froide. Après une demi-heure, centrifuger. Laver deux fois par centrifugation avec de l'alcool à 50-55°. Pour le dosage des matières grasses, centrifuger une fois avec un mélange d'éther (20 cm³) et d'alcool à 95° (10 cm³), puis deux fois à l'éther. Le résidu, séché à 105°, donne les albuminoïdes.

CHAPITRE II

Méthodes de dosage de la Caséine

I. — FILTRATION

Dans le but d'éviter l'action violente des agents chimiques, ZAHN [223] utilise pour séparer les protéines du lait un moyen mécanique; il s'adresse à la filtration sur bougie d'alumine. KEHRER [91] suit sa méthode. HERMANN [82] la modifie et fait usage de poudre de biscuit.

LEHMANN [104] filtre le lait sur des assiettes en argile de porosité bien déterminée et prétend ainsi isoler la caséine des protéines solubles du lait. Son procédé est adopté par TIEMANN [202]. Les chiffres qu'il obtient sont plus élevés que ceux fournis par la méthode de HOPPE SEYLER : la différence la plus faible relevée entre ces deux procédés est 0.06 p. 100 et la plus grande 0.62 p. 100; en moyenne pour 6 dosages, 0.298 p. 100. Cette méthode doit être rejetée; l'enduit gluant et visqueux restant sur le filtre, formé par le complexe naturel « caséinate de calcium + phosphate de calcium », retient toujours par adsorption de l'albumine et de la globuline en quantité très variable.

VAN SLYKE et BOSWORTH [212] recommandent la filtration mécanique du lait et proposent d'utiliser une forme spéciale de filtre que BRIGGS [28] employait pour séparer les parties solubles des terres. Le lait est versé dans une enceinte tubulaire entourant un filtre Pasteur-Chamberland. Au moyen d'une pompe, on comprime de l'air dans cette enceinte (pres-

sion de 40 à 45 livres par pouce carré) forçant ainsi les parties solubles à traverser le filtre de l'extérieur vers l'intérieur.

HUGOUNENQ [89] a montré « que les filtres en porcelaine laissent passer très inégalement les substances albuminoïdes; la porcelaine d'amiante est traversée plus facilement que le biscuit des bougies Chamberland. Ce passage s'accompagne de plus, de modifications chimiques ».

En conclusion, la filtration ne peut constituer un procédé précis pour séparer quantitativement les protéines du lait. Il en est de même de l'ultra-filtration.

II. — PRECIPITATION PAR LES ACIDES

Les acides, directement ajoutés au lait, en précipitent plus ou moins complètement la caséine. FRENZEL et WEYL [66] ont depuis longtemps reconnu la supériorité de l'acide acétique sur les autres acides, organiques et surtout minéraux, pour effectuer cette séparation. La méthode la plus ancienne et aussi la plus connue est celle de HOPPE-SEYLER [88].

a) Méthode de Hoppe-Seyler

Etendre le lait de 20 fois environ son poids d'eau. Ajouter goutte à goutte une solution étendue d'acide acétique jusqu'à production d'un précipité floconneux. Faire passer dans le mélange un courant d'anhydride carbonique pur pendant 1/4 d'heure ou 1/2 heure. Laisser reposer 12 heures. La caséine et le beurre précipitent sous forme de flocons caillébotés. Le sérum surnageant est limpide. Il se laisse facilement filtrer.

Recueillir alors le précipité sur un filtre taré. Laver avec soin. Sécher le filtre et son contenu à l'étuve à 110°. Laisser refroidir sous la cloche à acide sulfurique. Peser. On a ainsi la quantité de caséine et de matières grasses contenues dans la prise d'essai. Le filtre est débarrassé des matières grasses par épuisement à l'éther dans un appareil Soxhlet. La différence donne le poids de caséine.

D'après DUCLAUX [50], il est difficile de discerner dans la précipitation le moment où l'on doit cesser l'addition d'acide acétique. Cet instant n'est pourtant pas tellement délicat à saisir; si l'on utilise de l'acide suffisamment dilué, à 1 p. 100 par exemple, on peut très bien juger de la fin de l'opération à 1/2 centimètre cube près. On voit d'abord apparaître un fin précipité qui grossit peu à peu, se sépare du lactosérum et a tendance à se rassembler au fond du ballon.

De plus, le courant de gaz carbonique pare à l'insuffisance d'acide. Son action est à la fois chimique et physique : d'une part, il détruit l'équilibre du milieu (*complexes calciques*) et assure la complète précipitation de la caséine. D'autre part, son passage par un véritable brassage mécanique du mélange assure un contact intime entre le réactif et la caséine. Les flocons du précipité s'agglomèrent facilement et la filtration est rapide. Le filtrat est clair tandis qu'en l'absence du CO_2 il est toujours opalescent.

b) Méthode de Milon et Commaille [132]

Dans cette méthode, on procède au dosage systématique des différentes matières albuminoïdes dont on admet la présence dans le lait. Elle ne présente aujourd'hui qu'un intérêt historique, après avoir été fort pratiquée en son temps.

« On mesure 20 cm³ de lait, on les étend de 4 volumes d'eau, puis on y verse 5 à 6 gouttes d'acide acétique à 10°. On agite pour bien opérer le mélange et immédiatement se fait un coagulum nageant librement dans la masse du liquide. Le coagulum fournit le dosage du beurre et de la caséine. Le liquide sert à déterminer l'albumine, la lactoprotéine, le sucre de lait et les sels. On jette le coagulum sur un filtre, à travers lequel passe rapidement le liquide que l'on met de côté. Le coagulum est lavé 3 ou 4 fois sur le filtre même, avec le moins d'eau possible, parce que celle-ci dissoudrait des traces de caséine; on fait succéder à l'eau distillée de l'eau alcoolisée marquant 40° à l'alcoomètre centésimal, et tout le liquide de lavage, alcoolique ou non, est rejeté. Le contact de l'eau alcoolisée contracte le coagulum et permet de l'enlever du filtre étaié sans la moindre perte.

Le coagulum, détaché du filtre, est épongé dans du papier buvard, puis bien délayé dans de l'alcool anhydre; le tout est jeté sur un filtre; le liquide écoulé est remplacé par de l'éther, lequel est additionné de 1/10^e d'alcool absolu et l'on continue les lavages avec ce mélange tant qu'on entraîne de la matière grasse. On reconnaît que celle-ci est bien enlevée quand le liquide éthéré qui grimpe en dehors de la douille de l'entonnoir s'évapore sans laisser la moindre trace de résidu graisseux. L'addition d'un peu d'alcool dans l'éther a pour but d'empêcher l'écoulement trop rapide de ce liquide et, par suite, de prolonger son contact avec la matière du caséum.

Beurre : Les liqueurs alcooliques et éthérées sont réunies dans une capsule de verre tarée; la chaleur du bain-marie suffit pour chasser le liquide et le beurre est pesé.

Caséine : Le résidu, non dissous par l'alcool anhydre et l'éther, est entièrement constitué par la caséine que contenaient les 20 cm³ de lait coagulé par l'acide acétique; l'évaporation rapide de l'éther qui mouille ce coagulum livre, au bout de quelques minutes, une caséine d'un blanc pur, sèche, pulvérulente et que l'on pèse sans la moindre difficulté. Dans le lait de vache, nous n'avons pas observé de grands écarts pour le poids de caséine, malgré les diversités de race et de régime. Le poids de cette substance a varié seulement de 33 g. 5 à 36 g. 83 par litre. »

III. — PRECIPITATION PAR LES SELS

Parmi ces méthodes, celle de SCHLOSSMANN à l'alun de potassium est de beaucoup la plus exacte.

a) Méthode de Schlossmann [181]

Chauffer exactement à 40° au bain-marie 10 cm³ de lait dilué de 3 à 5 volumes d'eau distillée et verser 1 cm³ de solution concentrée d'alun de potassium. Attendre en agitant que la coagulation commence. Si elle ne se fait pas, ajouter de 30 en 30 secondes 1/2 cm³ de solution d'alun jusqu'au moment voulu, le tout restant à 40°. Pour faciliter la précipitation, on peut ajouter quelques cristaux d'un électrolyte destiné à gros-

sir les micelles, NaCl par exemple. Filtrer jusqu'à obtention d'un filtrat clair. Laver à l'eau le précipité. Traiter alors le filtre et son contenu par la méthode de KJELDAHL. Doser l'ammoniaque. On obtient ainsi l'azote de la caséine.

Cette méthode assure la séparation complète de la caséine. Son exécution est plus rapide que celle de HOPPE-SEYLER.

b) Méthode au sulfate de magnésium

La méthode au sulfate de magnésium a été préconisée par MITSCHERLICH [117] en 1874, puis modifiée par TOLMATSCHEFF [204], MAKRIS [117] et HOPPE-SEYLER [88].

A 10 cm³ de lait, ajouter 20 cm³ d'une solution saturée de sulfate de magnésium, puis autant qu'il veut s'en dissoudre, d'une pâte cristalline de sulfate de magnésium. La caséine est précipitée après 24 heures. Filtrer et laver avec la solution saturée de SO⁴Mg. Peser ou mieux appliquer au précipité la méthode de KJELDAHL (SEBELIEN).

STENBERG a, le premier, étudié cette méthode pour savoir si seulement la caséine était précipitée; il trouve qu'elle entraîne environ 1/6° des albumines vraies du lait.

MAKRIS constate que le filtrat privé de caséine, saturé à nouveau par du sulfate de magnésium, donne à l'ébullition un léger précipité.

SEBELIEN [187] étudie le pouvoir précipitant de différents sels sur le lait : SO⁴Mg, NaCl, KCl, NH⁴Cl, CaCl², et conclut que, seuls le sulfate de magnésium et le chlorure de sodium assurent une séparation quantitative de la caséine.

DUCLAUX [50] cherche à résoudre les deux questions suivantes :

1° Le précipité dû au sulfate de magnésium contient-il toute la caséine?

2° Le précipité contient-il d'autres matières albuminoïdes?

A la première, il répond non et prétend avoir obtenu un précipité floconneux de caséine par addition d'acide acétique à un filtrat exempt de caséine et d'albumine (la première ayant été éliminée par SO⁴Mg et la seconde par la chaleur).

SEBELIEN lui reproche de s'être servi, pour saturer le lait, de sulfate de magnésium cristallisé au lieu de la bouillie cristalline conseillée; ainsi la saturation n'est pas complète. De plus, DUCLAUX a expérimenté sur du lait, tandis que lui a opéré sur un mélange synthétique de caséine et de lactalbumine pures. Le précipité considéré par DUCLAUX comme de la caséine serait tout simplement de l'albumine que la simple ébullition n'a pas entièrement coagulée.

ZAHN [224] en effet, en 1870, a montré que la lactalbumine d'un sérum obtenu par filtration du lait sur bougie d'alumine ne coagule pas entièrement à l'ébullition. La fraction restant dans le filtrat peut être aussi importante que celle coagulée. Cette remarque essentielle nous autorisera à rejeter les méthodes qui utilisent uniquement la chaleur pour précipiter quantitativement la lactalbumine.

A la deuxième question DUCLAUX répond oui, car « si on redissout dans l'eau le précipité de caséine obtenu par le sulfate de magnésium, on obtient un liquide opaque comme du lait passant bien au travers des filtres et se troublant abondamment avant l'ébullition comme les liquides albumineux. Si même, on ajoute assez d'eau pour que le volume soit égal à 2 fois $1/2$ le volume du lait primitif, cette dissolution, qui ne devrait renfermer que de la caséine, se trouble à 60° comme l'albumine et abandonne la presque totalité de ce qu'elle renfermait. »

SEBELIEN reprend les expériences de DUCLAUX et jamais il n'obtient de précipité par ébullition d'une solution contenant de la caséine précipitée par $\text{SO}^{\circ}\text{Mg}$ ou NaCl . Tout au plus constate-t-il un trouble avant l'ébullition, trouble qui est d'ailleurs fonction de la quantité d'électrolytes présents dans le milieu. La solution prend alors l'aspect opaque du lait. Par refroidissement, elle devient limpide : il n'y a pas eu floculation.

Pour lui, DUCLAUX n'a pas éliminé la lactalbumine du précipité par des lavages assez prolongés ($\text{SO}^{\circ}\text{Mg}$ dans du lait devenu acide précipite la caséine et une partie de la lactalbumine). Si, en effet, on traite le précipité sans le laver, on ob-

tient à l'ébullition un véritable coagulum ne disparaissant pas par refroidissement.

Dans cette méthode au sulfate de magnésium, la lactoglobuline est précipitée en même temps que la caséine du lait. Comme elle existe en proportion très faible, l'erreur ainsi commise par excès n'est pas appréciable. Cependant ce procédé est long et ennuyeux. On ne doit l'utiliser que si l'on veut avoir l'albumine sans globuline.

IV. — DOSAGE

DE LA CASEINE DANS LE LAIT DEGRAISSE

ADAM soutire le liquide opalescent qui se sépare dans le dosage du beurre, selon son procédé bien connu; il l'additionne de 2 cm³ d'acide acétique à 15 p. 100, complète le volume à 100 cm³ avec de l'eau distillée, agite très vivement avec une baguette de verre pendant une minute et laisse le précipité se déposer. La caséine est recueillie sur un filtre taré, lavée à l'eau distillée, séchée à l'étuve et pesée après refroidissement sous une cloche à acide sulfurique.

« Le grave reproche à faire à cette méthode, d'après PATEIN et DEVAL [147], c'est qu'elle prescrit toujours la même quantité de 2 cm³ d'acide acétique, c'est-à-dire d'un corps vis-à-vis duquel la caséine est singulièrement sensible. Si l'on joint à cela les différences d'alcalinité que peut présenter le lactosérum pour des causes variées : évaporation à l'air, ancienneté du réactif, etc., on comprendra que le volume d'acide à employer est au contraire, essentiellement variable et doit être déterminé avec soin dans chaque cas particulier. » Aussi modifient-ils la méthode de la manière suivante :

« Après séparation de la couche éthéro-butyrique dans le dosage du beurre par la méthode d'ADAM, amener le lactosérum et les eaux de lavage à 50 cm³ avec de l'eau distillée. Verser *goutte à goutte de l'acide acétique à 15 p. 100 en agitant continuellement* jusqu'à ce que le trouble produit soit persistant et cesse d'augmenter. Verser encore 1 à 2 gouttes d'acide acétique. S'assurer que le liquide a une réaction franchement

acide au tournesol. Verser alors 30 cm³ d'alcool à 90°. Compléter le volume à 100 cm³. Agiter vivement et laisser reposer. Vérifier alors qu'une goutte d'acide acétique dilué ne trouble pas la liqueur, c'est-à-dire que la précipitation est complète.

Après 12 heures au moins de repos, recueillir le précipité, le laver avec un mélange à parties égales d'eau et d'alcool à 90°. Essorer le filtre par pression entre plusieurs feuilles de papier à filtrer. Peser après dessiccation à l'étuve à 100° et refroidissement en présence d'acide sulfurique. »

PIETTRE [155] a proposé une modification très intéressante de ce procédé; il a reconnu que pour obtenir une séparation rapide et facile des protéines précipitées, il fallait chasser complètement l'éther, l'alcool et l'ammoniaque, avant d'acidifier le liquide soutiré.

« Le liquide obtenu, après séparation des matières grasses par la méthode d'ADAM, est additionné d'eau distillée, jusqu'à 500 cm³ environ. On porte alors au bain-marie jusqu'à ce que l'éther, l'alcool et l'ammoniaque aient été complètement chassés. C'est là *le point essentiel*. Ceci fait, on étend avec de l'eau distillée à 99 cm³ à la température de 15°, on porte au bain-marie en couvrant pour réduire le plus possible les pertes par évaporation, puis on ajoute goutte à goutte 1 cm³ d'acide acétique à 15 p. 100.

Dans ces conditions, on a un beau précipité cailleboté, quelquefois lamelleux et même grenu si on agite vivement, qui se dépose en moins d'une heure laissant une liqueur parfaitement limpide. Le précipité est lavé, séché à 105° et pesé à poids constant.

L'ensemble des opérations (moins la dessiccation du filtrat) ne dépasse guère 3 à 4 heures. Pendant l'évaporation des réactifs (alcool, éther, ammoniaque), on évitera une trop grande concentration qui provoque ordinairement la formation d'une légère pellicule protéidique à la surface du liquide; dès qu'elle commence à apparaître, il suffira d'ajouter une quantité convenable d'eau distillée. On se rend très aisément compte, sans autre réactif que l'odorat, de l'élimination de ces trois réactifs.

Cette technique se recommande pour sa simplicité et sa rapidité. »

Nous venons d'étudier les méthodes les plus couramment utilisées pour le dosage de la caséine. Il en est encore bien d'autres, faisant appel à des principes différents (1). Nous indiquerons comme techniques types celles de HART, de ROBERTSON et de ARNY et SCHAEFER.

1° Méthode de Hart [80].

Introduire dans une fiole d'Erlenmeyer de 200 cm³ environ, 10 cm³ 5 de lait. Diluer avec 75 cm³ d'eau distillée; ajouter 1 cm³ à 1 cm³ 5 d'une solution d'acide acétique à 10 p. 100. Agiter violemment. Recueillir la caséine précipitée sur un filtre. Laver à l'eau froide pour éliminer les dernières traces d'acide. Introduire alors filtre et précipité dans un Erlenmeyer avec 75 à 80 cm³ d'eau distillée exempte d'acide carbonique, puis 10 cm³ de potasse N/10. Boucher la fiole et agiter violemment; dès que la caséine est dissoute, verser quelques gouttes de phénolphtaléine et titrer l'excès d'alcali avec une solution de SO³H² N/10.

La différence entre les quantités d'acide et d'alcali donne directement le pourcentage en caséine. L'opération dure moins de deux heures et donne des résultats satisfaisants.

MATTHAIPOULOS [126] a donné aussi en 1908 une méthode de dosage de la caséine fondée sur son acidité.

2° Méthode de Robertson [174].

Etendre à 250 cm³, 50 cm³ de lait. Verser peu à peu en agitant 75 cm³ d'acide acétique N/10. Décantier le précipité sur un filtre; le laver à l'eau; le laisser égoutter pendant une heure, puis l'introduire avec le filtre dans un becherglass avec 100 cm³ de soude N/10. La dissolution de la caséine est complète en 10 minutes, sous bonne agitation. Séparer par filtration les fibres de papier et prendre l'indice de réfraction du filtrat, avec un réfractomètre de Pulfrich à la température de 20°. L'application d'une formule donne alors le pourcentage de caséine.

(1) La méthode de dosage par la présure, appliquée dans l'industrie fromagère, ne peut trouver place ici, vu son inexactitude.

3^o Méthode de H. V. Arny et H. H. Schaeffer [7].

Précipiter 5 cm³ de lait par 5 cm³ d'une solution titrée d'alun de fer ammoniacal à 48 g. 222 de $\text{FeNH}^+(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ par litre. Filtrer au bout d'une heure en s'aidant du vide. Laver soigneusement le précipité. Recueillir le filtrat et les eaux de lavage; y doser l'excès de fer employé. A cet effet, ajouter au liquide précédent 3 cm³ d'HCl à 31 p. 100 et 2 g. de KI. Laisser en contact 30 minutes à 40°. L'iode mis en liberté est titré par une solution d'hyposulfite N/50.

1 cm³ de solution d'alun correspond à 0 g. 05934 de caséine.

CHAPITRE III

Méthodes de préparation de la Caseine pure

C'est HAMMARSTEN qui, le premier, s'est occupé de préparer de la caséine pure en vue de recherches scientifiques. Sa technique est la suivante :

Le lait étendu de 4 volumes d'eau distillée est additionné d'une quantité suffisante d'acide acétique pour que le taux de celui-ci atteigne environ 0.075-0.100 p. 100. Avec un tel degré de dilution, non seulement la caséine se sépare sans perte appréciable, mais elle se dépose extraordinairement vite et forme en peu de temps une masse compacte au-dessus de laquelle se trouve le sérum dilué, liquide jaune verdâtre, qui peut être facilement siphonné. De l'eau distillée remplace en égal volume le liquide extrait; on agite le mélange, on laisse déposer et on recommence les opérations jusqu'à ce que les eaux de lavages ne renferment sensiblement plus de sels de calcium.

On dissout alors la caséine dans la plus petite quantité d'ammoniaque N/10 possible. La solution est filtrée sur amiante; elle passe claire ou légèrement opalescente. La caséine en est précipitée par l'acide acétique dilué comme s'il s'agissait du lait originel. Lavages, redissolutions et reprécipitations sont recommencés deux à trois fois. La caséine est enfin lavée jusqu'à ce que toute trace d'acide soit enlevée. On filtre, on traite par l'alcool, puis l'éther.

La caséine ainsi obtenue laisse de 0.30 à 0.40 p. 100 de cendres à la calcination.

BECHAMP [16] prétend par le procédé suivant, avoir obtenu de la caséine rigoureusement exempte de cendres :

« Le lait préalablement refroidi est additionné d'une quantité d'acide acétique qui est exactement celle nécessaire pour saturer les bases auxquelles la caséine et la lactalbumine sont unies dans le lait, soit environ 2 cm³ 9 d'acide acétique monohydraté par litre de lait moyen. La précipitation de la caséine est totale dès que le lait, additionné peu à peu d'acide acétique, fait virer le papier de tournesol à la teinte pelure d'oignon, absolument comme lorsqu'on sature un carbonate par un acide.

La caséine se sépare en un précipité volumineux entraînant les globules et les microzymas laiteux. On jette ce magma sur plusieurs filtres, car la filtration est longue. Après 2 ou 3 lavages à l'eau, la masse détachée des filtres est délayée dans une quantité d'eau double du volume du lait employé et traitée par une dissolution de sesquicarbonate d'ammoniaque, pour redissoudre la caséine, en en employant assez pour que le mélange devienne très légèrement alcalin. La solution, troublée par les globules laiteux restés en suspension, est versée sur plusieurs filtres, car la filtration est encore plus lente.

La solution de caséinate d'ammoniaque filtrée est, à son tour, précipitée par l'acide acétique en quantité strictement nécessaire; la caséine se sépare alors comme un précipité ordinaire qui s'agglomère un peu et qu'on peut laver par décantation.

Après 4 redissolutions par le sesquicarbonate dans les mêmes conditions et reprécipitations par l'acide acétique, la caséine est généralement pure, ne laissant plus à l'incinération une quantité de cendres appréciables sur un gramme. L'eau de la précipitation filtrée ne précipite plus par l'alcool, ce qui prouve que la lactalbumine et la galactozymase, entraînées par la caséine, ont été enlevées par les lavages : les dernières eaux de lavage ne doivent même plus louchir par l'addition d'un volume double d'alcool à 94° ».

Pour VAN SLYKE et BAKER [209], la caséine obtenue en suivant la technique de HAMMARSTEN n'est pas absolument pure. Elle contient du phosphate de chaux, du caséinate de calcium

et probablement aussi des produits résultant de son hydrolyse par les acides et les alcalis servant à sa purification.

En étudiant un travail de VAN SLYKE et BOSWORTH [213], ces auteurs font cette remarque essentielle : dans le lait coagulé par fermentation lactique tout le calcium et le phosphore inorganique sont solubilisés. Cette observation leur suggère l'idée qu'un acide introduit dans le lait d'une manière se rapprochant de l'acidification naturelle progressive, permettrait peut-être d'obtenir de la caséine très pure.

La première précaution sera donc d'assurer la répartition immédiate de l'acide à mesure de son apport et d'éviter toute coagulation à son point d'arrivée dans le lait. Ce résultat est obtenu en amenant l'acide au fond du vase par un tube capillaire de 1 mm. 5 à 2 mm. dont l'extrémité légèrement courbée se termine par une ouverture écrasée et élargie. Ce tube débouche tout près de l'agitateur mécanique qui doit tourner assez vite pour assurer un brassage complet de la masse, sans produire trop de mousse. A cet effet, l'agitateur ne sera pas placé au centre, mais au bord du vase.

Les auteurs ont utilisé les acides acétique, lactique et chlorhydrique. Toutefois leur préférence va soit à l'acide lactique N, soit au mélange :



Le lait écrémé par centrifugation, puis amené à 15° est versé dans l'appareil, l'agitateur tournant aussi rapidement que possible (2.000/3.000 tours-minute). L'acide doit arriver lentement pour ne pas provoquer une coagulation trop appréciable, ce dont on s'assure à l'aide d'un témoin de sédimentation (« sedimentation test ») :

Quelques centimètres cubes de lait sont centrifugés. Si après décantation, il reste un dépôt dans le tube c'est que l'acide a été versé trop rapidement et les flocons formés sont trop grossiers. En général, les premiers 45 cm³ doivent être versés en 30 minutes. L'addition d'acide est ainsi continuée jusqu'à concurrence de 60 cm³. On verse avec précaution jusqu'à ce que le point de coagulation soit presque atteint.

Avant d'ajouter de nouvel acide, on attend 3 heures en agi-

tant doucement (environ 500 tours par minute). L'approche du point de coagulation peut être facilement décelé : quelques centimètres cubes de lait acidifié, dilués d'un volume égal d'eau sont centrifugés. La caséine doit se séparer complètement.

Lorsque cet essai est positif, l'addition d'acide est interrompue. Pendant les derniers moments, la formation de mousse peut être à craindre, on y remédie à l'aide d'alcool octylique.

Après agitation lente pendant trois heures juste au degré d'acidité inférieur au point de coagulation de la caséine, on reprend l'addition de l'acide en agitant de nouveau comme au début, de manière que le coagulum soit aussi divisé que possible. On fait arriver de l'acide jusqu'au moment où l'épreuve de la centrifugation sépare nettement le culot de caséine du lactosérum surnageant.

Ordinairement, il faut 90 cm³ d'acide lactique N ou du mélange chlorhydro-acétique pour un litre de lait. Avec l'acide chlorhydrique seul, 75 cm³ suffisent. La coagulation terminée, on agite encore le mélange lentement de 2 à 4 heures.

La caséine est alors lavée par centrifugations et décantations successives (4 à 5 en général) jusqu'à ce que l'eau de lavage soit trouble : à ce moment, elle est débarrassée des électrolytes. Elle contient encore du phosphate de calcium et de magnésium qu'on pourra éliminer par un traitement spécial. On la fera dissoudre dans de la soude N/10 en quantité strictement nécessaire, en prenant soin que le pH de la solution ne dépasse pas la valeur 7. Les phosphates de calcium et de magnésium restent alors en suspension et sont éliminés par centrifugation. On soumet la solution de caséine préalablement diluée au même traitement que le lait originel en utilisant de préférence l'acide acétique normal. Les traces de phosphates sont ensuite éliminées par électrolyse.

La caséine ainsi purifiée est alors traitée avec de l'alcool à 70-80° chaud, puis avec de l'alcool à 95° (2 fois), avec de l'éther anhydre (3 fois) et enfin avec du benzène ou du toluène.

Le produit est étalé sur une surface plate et unie et mis à sécher en plein air. Durant le séchage, il faut triturer doucement la masse avec une spatule afin de la maintenir en poudre fine.

L'observation scrupuleuse de tous les détails indiqués dans cette préparation permet l'obtention d'une caséine très pure, pauvre en cendres et en phosphore.

Le fait de maintenir la caséine non coagulée à un degré d'acidité juste inférieur au point de coagulation fournit un produit contenant le minimum de phosphore, soit 0.80 p. 100. Ce traitement permet la dissolution du phosphate en suspension dans le lait. Il ne faudrait pourtant pas laisser la caséine en imminence de précipitation pendant plus de 6 heures, des phénomènes d'hydrolyse pouvant se produire.

Après sa coagulation, la caséine est abandonnée 2 à 4 heures à une agitation lente : à ce moment, ainsi que l'ont vérifié VAN SLYKE et BAKER, le pH du caillot de caséine est d'environ 4.5-4.6, c'est-à-dire légèrement en dessous du point isoélectrique. Ainsi le caséinate de calcium est décomposé, laissant une caséine pauvre en cendres, 0.05 à 0.15 p. 100.

Le temps indiqué est suffisant, mais si par raison de commodité, on est obligé d'attendre pour continuer la préparation, la caséine peut rester dans cet état, sans crainte d'hydrolyse.

Cette méthode permet d'obtenir de la caséine acide se prêtant parfaitement aux expériences de laboratoire.

PORCHER [160] a indiqué dans son livre « Le Lait au point de vue colloïdal » une technique assez voisine qu'il est intéressant de rapporter :

« Dans une cuve de 100 litres, nous mettons 10 litres de lait écrémé frais. Nous y ajoutons 40 litres d'eau distillée, puis, en mince filet et en agitant vigoureusement avec un fouet à lamelles métalliques comme celui qui sert à battre la crème, on apporte HCl N/2. Il est facile de suivre à l'œil nu la marche de la précipitation, et l'habitude que nous en avons maintenant dans notre laboratoire fait que le virage, — si nous pouvons nous permettre cette expression, étant donné qu'elle s'applique au passage d'une caséine encore gonflée, en imminence de précipitation, à la formation nette de flocons — se fait pour une masse aussi grande de liquide avec une très petite marge d'acide.

Les premiers flocons diffluent nagent encore dans un liquide laiteux; nous sommes près du point isoélectrique, entre 4,8 et 5. En ajoutant quelques cm³ de HCl N/2, le liquide

s'éclaircit, l'apparence laiteuse disparaît, des flocons très nets se forment qui nagent au milieu d'un sérum jaune verdâtre limpide.

Si on jette quelques cm³ sur un filtre en papier, le sérum tout à fait clair passe très bien, alors que lorsque le liquide était laiteux, il passait difficilement, et encore trouble.

La quantité d'acide employée correspond pour la dilution du lait à 120-125 cm³ de HCl N/2 par litre. Les flocons se rassemblent rapidement au fond de la cuve pour former une masse assez compacte et le liquide est siphonné. Puis, la masse de caséine impure est jetée sur une passoire munie d'une toile, et lavée avec une grande quantité d'eau distillée. La première eau est un peu trouble, mais rapidement, elle passe claire.

Si le lavage était continué pendant trop longtemps, la caséine se gonflerait et l'eau redeviendrait trouble. Il faut savoir s'arrêter à ce moment. La caséine est jetée dans une grande capsule, puis broyée avec application dans plusieurs litres d'eau distillée qu'on ajoute graduellement et redissoute par de l'ammoniaque fortement diluée et en agitant vigoureusement.

L'apport d'ammoniaque doit être extrêmement surveillé ; *dans aucune circonstance, il ne faut dépasser pH = 7.* Toutes ces opérations sont d'ailleurs suivies avec le potentiomètre à l'électrode à quinhydrone qui permet de faire des déterminations rapides.

La caséine correspondant aux 10 litres de lait écrémé, les pertes immanquables étant laissées de côté, est amenée ainsi à occuper un volume de 10 litres environ en solution ammoniacale neutre ou légèrement acide de pH < 7. On en précipite la protéine par HCl N/2. Nous savons qu'il faut une quantité de cet acide quatre fois moindre que lorsqu'il s'agit de la précipitation initiale. Il est même préférable de diluer la quantité de HCl N/2 nécessaire avec quatre fois son volume d'eau. L'apport de cet acide est fait lentement en battant énergiquement le caséinate avec le fouet métallique. Les flocons que l'on obtient dans ces conditions sont beaucoup plus menus que lors de la première précipitation; le point isoélectrique est surveillé dans les mêmes conditions que lorsqu'il s'agissait du lait;

La caséine rassemblée est jetée sur une passoire munie d'un linge, lavée avec une grande quantité d'eau distillée, jusqu'à ce que l'eau de lavage ne donne avec le réactif de Nessler qu'une coloration jaune extrêmement pâle.

Cette caséine est redissoute une seconde fois dans l'eau ammoniacale, reprécipitée encore par l'acide chlorhydrique, et l'on recommence une troisième fois les opérations.

La caséine a donc été l'objet de quatre précipitations en comprenant celle qui a porté sur le lait.

Le lavage lors de la dernière précipitation doit être tout à fait soigné de façon qu'avec le réactif de Nessler, on n'obtienne plus de coloration.

La caséine est rassemblée, filtrée sous le vide de manière à recueillir un gâteau épais, ferme, aussi peu humide que possible. Ce dernier est broyé avec soin dans de l'alcool à 90°, alcool qui va se trouver dilué par l'eau du gâteau de caséine, puis on porte, par petites portions, au Soxhlet, en ayant soin de mettre la caséine dans un nouet de toile fine. On lave à l'alcool à plusieurs reprises; une dizaine de rinçages peuvent être ainsi réalisés.

L'alcool déshydrate la caséine en même temps qu'il la lave. Il se fait un éther, du caséinate d'éthyle, qui est déjà un peu soluble dans l'alcool, si bien que, de ce côté, il y a des pertes, mais elles ne sont pas considérables. Cette réaction entre la caséine et l'alcool ne semble pas dénaturer la protéine, le caséinate d'éthyle étant très peu stable et se dissociant facilement.

La caséine traitée par l'alcool est filtrée sous le vide, puis le gâteau obtenu comprimé, bien tassé, est broyé ensuite dans de l'éther anhydre. On refait un nouet avec un linge fin pour porter au Soxhlet, et on fait marcher pendant plusieurs heures. La caséine est peut-être ainsi lavée une vingtaine de fois par l'éther. On arrête à ce moment et on recueille la caséine que l'on tasse sous un vide léger pour la débarrasser de la plus grande partie de l'éther qui la mouille; ensuite, on la porte dans un exsiccateur dans lequel on fait un vide modéré. On obtient ainsi une poudre extrêmement fine, très friable qui pendant longtemps encore sent l'alcool, les nombreux lavages à l'éther n'ayant pas débarrassé la caséine de l'alcool qui

l'avait imprégnée, parce qu'il y était resté fixé sous la forme d'éther éthylique.

Nous n'avons jamais observé que la dessiccation de la caséine, avec les précautions que nous prenons, ait déterminé à la surface de la pâte encore humide de l'éther du Soxhlet, comme une croûte difficile à pulvériser. Nous n'avons pas eu besoin de recourir à un traitement par l'éther de pétrole au point d'ébullition élevé (60° par exemple), le benzène ou le toluène, comme le recommandent VAN SLYKE et BAKER, mais nous reconnaissons bien volontiers que l'emploi de ces dissolvants neutres ne peut donner que d'excellents résultats. »

CHAPITRE IV

Séparation de la lactalbumine

Pour préparer la lactalbumine, il faut d'abord se débarrasser de la caséine. A cet effet, on coagule le lait par la présure ou les acides. Le sérum obtenu après filtration, donne par chauffage un précipité dû aux albumines solubles. D'après STEWART cette floculation est quantitative, si l'on maintient le sérum à la température de 80° pendant 30 minutes. Cette observation n'a jamais été confirmée.

ZAHN [224], au contraire, avait déjà remarqué en 1870 que la chaleur est insuffisante pour déterminer une précipitation quantitative de l'albumine. SCHLOSSMANN [181], SEBELIEN, HOFMEISTER, PALMER et SCOTT... partagent cette opinion et l'étendent à tous les liquides biologiques.

Cette fraction azotée du lactosérum coagulable par la chaleur, mérite seule le nom d'albumine, d'après VAN SLYKE [208]. En vue de son dosage, il étudie avec soin la durée du chauffage provoquant la meilleure précipitation. L'optimum est fixé à 15 minutes. La technique à observer est la suivante :

Précipiter la caséine en chauffant au bain-marie à 40-42° le lait préalablement dilué de neuf fois son poids d'eau et additionné d'acide acétique. Puis porter le filtrat au bain-marie bouillant pendant un quart d'heure. Recueillir l'albumine sur un filtre. La sécher. Y doser l'azote par la méthode de KJELDAHL. Multiplier le chiffre trouvé par le coefficient 6,25 pour avoir le poids d'albumine.

Cependant POPPER [159] montre que par ébullition, 75 p. 100 seulement de la lactalbumine sont précipités. BERG [17] et UNGDADE [207] obtiennent toujours une floculation incomplète, même quand la concentration en ions H du milieu est optimum. La teneur en azote du précipité oscille entre 40 et 50 p. 100 de l'azote total du lactosérum.

W. GRIMMER, C. KURTENACKER et R. BERG [72] ont repris cette question. Ils aboutissent aux conclusions suivantes :

Les albuminoïdes du lactosérum ne sont qu'en partie précipitables par la chaleur. Par addition d'acide ou de sel, on ne parvient jamais à une floculation quantitative. On ne peut qu'arriver à un optimum de coagulation, sous la dépendance de la concentration en ions H. Les limites assez rapprochées de cet optimum vont de 54 à 62 p. 100 de l'azote total du lactosérum, en moyenne 58,4 p. 100. Les sels à utiliser de préférence sont : l'alun de potassium, le bisulfate de sodium et le chlorure de calcium, celui-ci est surtout approprié à la désalbumination du lait en vue de la fabrication industrielle du lactose.

PIETTRE [154] a appliqué à la séparation de l'albumine du lactosérum, la méthode à l'acétone qu'il a instituée avec VILA pour le traitement analytique du sérum sanguin. Rapportons son procédé :

« Il convient tout d'abord de se débarrasser de la caséine en la précipitant en fins grumeaux, ce qui facilite l'obtention rapide du lactosérum et même le lavage de la caséine précipitée. On effectue la coagulation en agitant très vivement le lait maintenu aux environs de 35° pendant qu'on ajoute goutte à goutte une solution assez concentrée de présure commerciale. En quelques minutes, suivant la force de la diastase, le lait se trouble (*sic*), on voit apparaître de fins grumeaux de caséine et se séparer le lactosérum. On filtre sur trompe, en écrasant, à la fin de l'opération, les grumeaux de caséine qui tendent à s'agglomérer. Un litre de lait donne en moyenne 925 cm³ de sérum, contenant une protéine susceptible de s'insolubiliser dans l'eau et la lactalbumine qu'il s'agit de séparer. »

Pour réaliser cette séparation, on commence par neutraliser la très faible alcalinité que possède le lactosérum vis-à-vis du tournesol sensible, marque Gallois. Il faut environ 0 cm³ 45 de HCl N/100 par centimètre cube, mais l'expérience montre qu'on doit atteindre une légère acidité en vue des opérations ultérieures. On ajoute donc au sérum, en HCl N/10 ou N/1, la quantité d'acide correspondant à 0 cm³ 7 de HCl N/100 par centimètre cube (dans nos essais 0 cm³ 706 permettaient la séparation presque parfaite des deux protéides) et l'on épuise avec soin à l'éther, en évitant une trop forte émulsion.

Le liquide décanté, parfaitement clair, est alors précipité aux environs de 0° à l'aide d'acétone également refroidie (1 vol. à 1 vol. 35 d'acétone), et après quelques instants de repos, filtré sur trompe avec les précautions d'usage pour retenir les gros flocons peu consistants des protéides. Bien égoutté, le précipité est seulement lavé à l'éther sec à une ou deux reprises. On le détache à l'aide d'un scalpel en mouillant le filtre, puis on le met dans une capsule en présence d'un volume d'eau distillée correspondant au dixième du volume de sérum engagé. Après 12 heures de contact on écrase avec soin les grumeaux qui persistent, rend le mélange bien homogène, fait un volume exact et détermine sur de petits essais (0 cm³ 5 étendu à 1 cm³ avec de l'eau distillée) la très petite quantité de HCl N/100 provoquant la meilleure précipitation de la protéine insoluble. Avant d'ajouter à l'ensemble de la liqueur trouble l'acide N/10 ainsi calculé, on la sature à froid d'éther. On laisse reposer au froid et on centrifuge.

Si, comme il a été dit plus haut, on a ajouté du premier coup 0 cm³ 706 de HCl N/100 par centimètre cube de lactosérum, cette dernière manipulation un peu longue se trouve évitée. Il suffit de rendre homogène le mélange bien refroidi en l'agitant vigoureusement avec de l'éther.

La centrifugation sépare un très beau liquide, parfaitement limpide, de teinte blonde (albumine en solution) et un culot blanchâtre (protéine insoluble) qui peut être lavé, une ou deux fois avec de l'eau saturée à froid d'éther, par centrifugation.

La matière floconneuse blanche se rapproche des globulines par ses caractères physiques et ses réactions chimiques; cependant, comme la caséine, elle contient toujours des subs-

tances minérales (p. 100 de cendres, nous avons eu 66,68 de CaO et 29,70 de P^2O^5). Son faible pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = -31^{\circ}12$ en solution aqueuse sodique, semble la différencier de la caséine :

$$[\alpha]_D = -116^{\circ} \text{ (LINDET et AMMANN).}$$

La teneur du lait en cette protéine oscille autour de 2 g. 3 par litre.

La lactalbumine est purifiée par précipitation globale ou fractionnée à l'aide d'alcool. Dans le premier cas, on ajoute un tiers ou un demi, suivant la concentration, de son volume d'alcool à 96°, laisse déposer au froid, centrifuge, reprend par l'eau distillée et filtre. Dans le second, on ajoute la même proportion d'alcool mais en 4 à 5 fois et en refroidissant énergiquement dans un mélange glace et sel avant chaque centrifugation. Les 3 premiers précipités isolent en général la lactalbumine à l'état d'une belle matière sirupeuse blonde très semblable à la sérum-albumine purifiée. Elle se prend brusquement au froid en une masse solide blanche et se ramollit de nouveau à la seule chaleur de la main. »

TROISIÈME PARTIE

**Exposé des méthodes analytiques utilisées
au cours de ce travail**

CHAPITRE I

Dosage de l'ammoniaque

I. — DESTRUCTION SULFURIQUE DES SUBSTANCES AZOTEES

Au cours du présent travail, nous avons eu à doser l'azote dans les différents éléments azotés du lait. Nous avons utilisé le procédé proposé par KJELDAHL [92], en 1883. Il consiste à transformer l'azote organique en ammoniaque à l'aide d'acide sulfurique concentré à l'ébullition.

Dans le cas du lait, la présence du beurre et du lactose difficilement détruits par l'acide sulfurique rend la méthode d'une exécution très laborieuse. GUNNING [74], en 1889, propose une modification à la méthode primitive de KJELDAHL. Elle consiste à traiter 0 g. 50 à 1 g. de la substance à analyser par 25 ou 30 cm³ d'un mélange, préalablement préparé par fusion d'une partie de sulfate de potasse et de deux parties l'acide sulfurique.

FLEURY et LEVALTIER [61] ont présenté en 1924 une étude comparée de la plupart des mélanges utilisés pour minéraliser la matière organique. Leurs essais ont porté sur de la caséine. Ils arrivent à cette conclusion que, seuls les mélanges à point d'ébullition élevé, tout en réduisant notablement le temps de la destruction sulfurique, assurent une transformation intégrale de l'azote en ammoniaque.

Les mélanges qui contiennent des oxydants, des réducteurs ou des catalyseurs peuvent occasionner des pertes d'azote allant jusqu'à 4 p. 100. Ils proposent un mélange « type » de composition suivante :

Acide sulfurique pur.....	5 cm ³
Acide phosphorique à 60° B.....	15 cm ³
Sulfate de potasse.....	5 g.

et ils insistent dans la technique sur la nécessité de poursuivre le chauffage pendant 15 minutes environ, après complète décoloration du milieu.

Ainsi modifiée, la méthode « permet de doser avec rapidité et exactitude l'azote d'un grand nombre de corps représentant la plupart des groupements azotés de la chimie organique, avec une légère restriction s'appliquant au groupe du pyrazol, chez lequel cependant la transformation de l'azote en ammoniacque atteint 96 p. 100 ».

Nous inspirant des conclusions de ce travail, nous avons utilisé les mélanges suivants pour minéraliser la matière organique :

Mélange de Fleury :

SO_4H^2 5 cm³ + PO_4H^3 15 cm³ + SO_4K^2 5 g.

Point d'ébullition : 401°-412°.

Mélange de Gunning :

SO_4H^2 1 cm³ + SO_4K^2 5 g.

Point d'ébullition : 327°-341°.

II. — MODES DE DOSAGE DE L'AMMONIAQUE

A) Examen critique de la méthode au formol de Ronchèse

Dans nos conditions d'expériences, nous avons souvent à doser des quantités appréciables d'ammoniacque (cas de l'azote total par exemple). Nous avons cherché la sensibilité de la méthode de dosage de l'ammoniacque par le procédé au formol de RONCHÈSE [175].

Lorsqu'à un sel ammoniacal, en solution neutre, on ajoute un excès de formol neutralisé, il se libère une quantité d'acide

proportionnelle à l'ammoniaque contenue dans le sel. L'acidité ainsi libérée est titrée avec de la soude diluée en présence de phénolphthaléine comme indicateur.

Cette méthode est très sensible lorsque la solution du sel ammoniacal est neutre ou faiblement acide. C'est ainsi que RONCHÈSE a pu titrer, dans les eaux, « des quantités d'ammoniaque inférieures à 1/10^e de milligramme avec une approximation le plus souvent inférieure à 2/100^e de milligramme ».

Mais lorsque le sel est en solution acide, il apparaît des difficultés croissant avec la quantité d'acide présent au point qu'à partir d'une certaine limite, le dosage devient imprécis.

Avant d'ajouter le formol, il est nécessaire de neutraliser la solution; or, les sels ammoniacaux agissent sur la phénolphthaléine en retardant l'apparition de la teinte rose; on est donc amené à ajouter quelques gouttes supplémentaires de soude, d'où une légère erreur par défaut. RONCHÈSE a déterminé la correction qu'il est ainsi nécessaire d'effectuer.

La neutralisation de la prise d'essai, lorsque le milieu est très acide, est une opération fort longue. On fait usage à cet effet de soutes de titres décroissants : soude au 1/4, soude N/10 puis N/50. Mais lorsqu'on arrive à la soude N/50, l'indicateur a pris une teinte vieux rose ou jaune rose, que modifie d'une manière peu appréciable l'addition ultérieure d'une goutte de même soude.

Au surplus, si la teneur de la prise d'essai en ammoniaque n'est pas très élevée, l'addition d'un excès de formol neutralisé ramène bien le milieu à l'acidité, mais il persiste toujours une très légère teinte jaune rose et lors de l'addition finale de la soude, rien n'est plus délicat que l'appréciation du virage.

Nous avons établi la limite de sensibilité de cette méthode et nous donnons un tableau montrant de quel ordre peuvent être les erreurs, lorsque les quantités d'ammoniaque à doser sont petites et le milieu fortement acide.

TABLEAU

10 cm ³ de la prise d'essai contenaient 15 mg. 4 de SO ⁴ (NH ⁴) ³ soit 3 mg. 26 d'azote			
Acide sulfurique N ajouté à la prise d'essai en cm ³	Soude N/50 versée en cm ³	Azote trouvé en milligrammes	ERREUR
0	11.25	3.25	0.3 %
10	11.25	3.25	0.3 %
20	11.10	3.21	1.5 %
30	11.10	3.21	1.5 %
40	11.	3.18	2.4 %
45	10.90	3.15	3.3 %
50	10.75	3.10	4.9 %
75	10.75	3.10	4.9 %

La méthode de RONCHÈSE diminuant de précision lorsqu'on veut déterminer l'azote d'un sel ammoniacal, en solution fortement acide, nous nous sommes adressés à un procédé plus sensible.

B) Technique par distillation

Principe :

L'ammoniac, base volatile, est déplacé de ses solutions par les bases fixes, telle que la soude. Il est entraîné par un courant de vapeur d'eau dans un réfrigérant fortement refroidi. Il se condense et arrive dans un verre contenant de l'acide titré. Le dosage de l'excès d'acide donne la quantité d'ammoniac fixé.

Appareil :

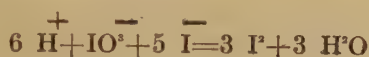
Nous nous sommes servis de l'appareil de PARNAS et WAGNER [146] qui est une modification de celui imaginé par PETRI et LEHMANN [149], mis en œuvre par PREGL [162], puis par G. MELLIÈRE et L. DE SAINT-RAT [129].

Dans ce dispositif, le lavage du ballon distillatoire est automatique et ne nécessite aucun démontage, ce qui se prête particulièrement aux dosages en série.

Quant au titrage de l'ammoniaque, nous l'avons effectué de différentes manières :

1° *Par la méthode iodométrique.*

Cette méthode satisfait aux plus grandes exigences. L'ammoniac est reçu dans de l'acide sulfurique N/100. Pour doser l'excès d'acide, il suffit d'ajouter à la solution de l'iodate et de l'iodure de potassium. Il se libère une quantité d'I strictement correspondante à la quantité d'acide. L'iode est dosé à l'aide d'une solution titrée de $\text{S}^{\circ}\text{O}^{\circ}\text{Na}^{\circ}$:



2° *Par la méthode alcalimétrique.*

a) **Titrage direct :**

L'ammoniac est reçu dans 20 cm³ d'eau bi-distillée (1) additionnée de deux gouttes d'une solution à 1 p. 1000 d'alizarine sulfonate de soude, sensibilisée suivant les données de MESTREZAT [130], ou encore de 4 gouttes d'une solution aqueuse de rouge de méthyle à 0 g. 25 p. 1000 (2).

Le titrage de l'ammoniac se fait au fur et à mesure de sa distillation à l'aide d'acide sulfurique N/100. Le virage est très net et le résultat précis. L'avantage de cette méthode est qu'on peut suivre la distillation et juger du moment où elle est terminée.

L'ammoniac passe d'abord abondamment puis, de plus en

(1) *Préparation de l'eau bidistillée :*

Distiller 4 litres d'eau distillée tenant 4 p. 100 d'acide phosphorique officinal. Rejeter les fractions de tête et de queue. Recueillir 2 litres. Les distiller après avoir ajouté 1 p. 100 d'hydrate de baryte cristallisé. Recueillir 1 litre d'eau dans un flacon paraffiné.

(2) *Préparation du rouge de méthyle :*

Rouge de méthyle : 0 g. 05. — Lessive de soude exempte de carbonate (D = 1.332) : 4 cm³ environ.

Triturer au mortier jusqu'à dissolution. Etendre avec 100 cm³ d'eau distillée environ. Neutraliser avec $\text{SO}^{\circ}\text{H}^{\circ}$ N/10 (1 cm³ 5 environ). La neutralité est indiquée par l'apparition d'un précipité. Compléter à 200 cm³ avec de l'eau distillée. Filtrer.

On peut aussi faire usage d'une solution de rouge de méthyle à 0 g. 02 p. 100 dans l'alcool à 60°.

plus lentement jusqu'à la fin de l'opération (courbe de distillation).

b) Titrage en retour :

L'ammoniac est reçu dans de l'acide sulfurique N/100. Pour titrer l'excès d'acide, porter le distillat à l'ébullition modérée (1 minute) pour chasser le gaz carbonique qui troublerait le virage. Verser dans le liquide refroidi 4 gouttes de solution de rouge de méthyle comme indicateur, puis de la soude N/100 jusqu'à virage au jaune franc.

Pour DURUPT [54], dans la méthode acidimétrique, la dissociation hydrolytique du sulfate d'ammoniaque fait qu'aucun indicateur ne donne de virage net, même en travaillant avec des liquides exempts de CO_2 ; pendant la neutralisation, la couleur vire de nouveau et on doit ajouter d'autres gouttes de soude, jusqu'à ce que la couleur demeure; il en résulte un surtitrage.

Par les deux méthodes acidimétrique et iodométrique, nous avons dosé comparativement l'ammoniaque de prises d'essai identiques de sulfate d'ammoniaque et dans nos conditions d'expériences, les résultats ont toujours été parfaitement concordants. Aussi avons-nous utilisé le plus généralement, vu sa simplicité, le titrage direct à l'acide sulfurique N/100.

La technique de PREGL est très avantageuse; elle permet de doser d'une manière rigoureuse, de faibles quantités d'ammoniaque en présence de doses incomparablement plus élevées d'acide. Avec une erreur relative inférieure à 1 p. 100, on peut doser 1/2 mg. d'azote ammoniacal.

Il sera donc indispensable, eu égard à sa sensibilité, de vérifier souvent par des opérations à blanc, la pureté des réactifs mis en œuvre.

III. — METHODE DE DOSAGE DU PHOSPHORE DANS LA CASEINE

Pour doser le phosphore dans la caséine, nous avons utilisé la méthode de COPAUX et suivi la technique publiée en 1926 par FLEURY et SUTU [62] pour l'essai des glycérophosphates.

Principe : La méthode de COPAUX [35] repose sur l'observation suivante due à MARIGNAC : « Quand une solution aqueuse d'acide phosphorique additionnée d'un autre acide (sulfurique, chlorhydrique, azotique) et de molybdate alcalin est agitée avec un excès d'éther, il se forme de l'acide phosphomolybdique qui, uni à l'éther et à l'eau, se sépare sous forme d'un liquide jaune très dense de composition à peu près constante. Le fait que un milligramme de $P^{2}O^{5}$ traité dans ces conditions est nettement précipité sous forme d'une gouttelette d'environ $1/20^e$ de cm^3 a déterminé COPAUX à l'utiliser pour doser le phosphore.

Minéralisation du phosphore : Technique de Fleury

« Dans un creuset de porcelaine, introduire une prise d'essai d'environ 0 g. 750 de caséine, puis 2 cm^3 d'une solution de nitrate de magnésie $(NO^3)^2Mg$, $6H^2O$ à 50 p. 100 et 3 cm^3 d'acide nitrique de densité 1,332. Ce creuset est suspendu dans un autre plus grand à l'aide d'un anneau de carton d'amiante pour réaliser un chauffage par bain d'air. Porter au bain de sable et chauffer doucement. Il est difficile d'éviter la mousse, d'où nécessité absolue de chauffer très lentement. On a avantage à opérer dans un creuset assez grand (1).

Quand l'acide azotique est volatilisé, on recouvre le creuset intérieur de son couvercle et on pousse le chauffage de façon à porter au rouge sombre le creuset extérieur et assurer ainsi sans projections la combustion lente de la matière organique

(1) Pour une prise d'essai de 0 g. 750 de caséine, faire usage d'un creuset haut, forme « Bayeux », d'une contenance de 45 cm^3 environ. Diamètre du fond : 22 mm. 5. Diamètre extérieur et hauteur : 45 mm.

et la décomposition tranquille du nitrate vers 300 à 400°, ce qui demande environ 20 à 30 minutes. On termine ensuite par un chauffage direct du creuset intérieur à feu nu au rouge, sur un bec Bunsen, pendant 20 minutes. Vu la résistance de la caséine à la destruction, il est souvent nécessaire, avant de chauffer directement le creuset intérieur, d'ajouter 2 cm³ d'acide nitrique.

Dosage du phosphore : Le résidu est repris après refroidissement par 3 cm³ 5 d'acide nitrique en ayant soin de faire passer cet acide sur le couvercle qui a pu être souillé par quelques projections. Les solutions et les eaux de lavage sont introduites dans une « ampoule de COPAUX », de façon à avoir un volume total de 15 cm³. Verser 20 cm³ d'éther débarrassé d'alcool par lavage à l'acide sulfurique. Puis ajouter progressivement par fractions de 3 cm³, 15 cm³ de solution de molybdate de soude (1), en agitant fortement après chaque addition. Centrifuger quelques minutes. Opérer dans les mêmes conditions sur une prise d'essai de solution étalon de phosphate monopotassique, telle que la quantité de P mise en jeu soit voisine de celle trouvée dans l'opération précédente.

(1) Pour la préparer, dissoudre à chaud 100 g. d'anhydride molybdique dans 32 g. de carbonate de soude sec dissous dans l'eau. Compléter à un litre.

QUATRIÈME PARTIE

ACTION QUALITATIVE DU FORMOL SUR LES PROTÉINES DU LAIT

On sait, depuis longtemps, que l'addition au lait de solution de formaldéhyde neutralisée augmente son acidité de titration; il est admis depuis les travaux de SCHIFF [180] en 1901, que cette augmentation d'acidité est due à la combinaison de l'aldéhyde formique avec les fonctions aminées, protéiques ou autres. SCHIFF [180] non seulement observe que des solutions neutres deviennent acides après l'addition de formol neutralisé, mais il réussit « à séparer les compositions qui se forment sous cette action » et il prépare un nombre considérable de méthylène-amido-acides.

Dans cette transformation, le groupe NH_2 devient $\text{N}=\text{CH}_2$ et d'un corps amphotère on passe à un corps acide. Il en résulte que tous les carboxyles (COOH) qui sont presque neutralisés par les groupements aminés (NH_2) sont libérés sous l'action de l'aldéhyde formique.

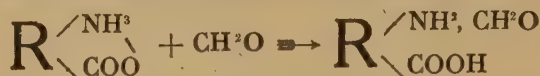
L'équation suivante rend compte de la réaction :



SORENSEN a montré que cette réaction est une réaction d'équilibre.

REINER et MARTON [166] en 1923, l'interprètent de façon différente. Il y aurait simplement addition du formol et de l'albumine donnant une combinaison méthylénique hydratée. Il est en effet impossible de dessécher complètement la formaldéhyde-albumine sans la décomposer. Le chauffage, avant d'éliminer la totalité de l'eau résiduelle libère le formol combiné (expérience réalisée sur la formaldéhyde-gélatine).

D'après les auteurs, la réaction devrait s'écrire :



La formule de ce produit d'addition explique sans plus que les aldéhydo-amino-acides ne présentent pas le caractère amphotère et se comportent comme des acides.

SCHWARZ [185] généralise et montre que toutes les aldéhydes aliphatiques comme aromatiques peuvent se combiner avec les matières protéiques.

TRILLAT et SAUTON [206] ont étudié les propriétés de la matière albuminoïde formolée. Le formol insolubilise les protides en général, (caséine, albumine du blanc d'œuf, gélatine, etc.). C'est ainsi que la matière albuminoïde du lait ayant subi l'action de la formaldéhyde acquiert une résistance considérable vis-à-vis des dissolvants et des réactifs.

« Elle est insoluble dans l'eau bouillante, l'alcool, l'éther, la benzine, l'acétone; les acides sulfurique, chlorhydrique et acétique étendus et même concentrés à 50 p. 100 se bornent à la gonfler après un contact de quelques heures; il en est de même de la potasse et de la soude étendues. L'ammoniaque, dont une faible proportion suffit à solubiliser la caséine, n'a plus aucune action, même à l'ébullition prolongée. »

Mais jusque-là, on a peu étudié l'influence du formol sur la précipitation quantitative des matières protéiques.

L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH [212] ont constaté que du lait formolé, filtré sur bougie de porcelaine, laisse passer presque toute son albumine dans le sérum, ainsi que le montre le tableau suivant :

Passage de l'albumine au travers des bougies de porcelaine

	Albumine dans 100 cm ³	p. 100 dans le sérum
Lait frais.....	0.266	
Sérum de ce lait frais.....	0.148	55.64
Sérum de ce lait formolé....	0.245	92.21

PALMER et SCOTT [144] confirment le sens de ces observations, mais trouvent des résultats plus faibles pour l'albumine dans le sérum du lait formolé. Ces divergences doivent vraisemblablement trouver leur explication dans la différence de porosité des bougies utilisées.

CHAPITRE I

Influence du formol sur la précipitation quantitative des protéines du lait

Technique

Pour la détermination des différents éléments azotés du lait, nous avons utilisé la méthode suivante :

I. — Azote total.

Evaporer au bain-marie 1 cm³ de lait dans le ballon même de KJELDAHL, où se fera la destruction. Pousser la dessiccation aussi loin que possible. Introduire le mélange de FLEURY ou de GUNNING. Chauffer doucement jusqu'à apparition de vapeurs sulfuriques. A ce moment, coiffer le ballon d'un petit entonnoir. Pousser le feu, la décoloration complète de l'acide est obtenue rapidement. Chauffer encore 15 minutes. Laisser refroidir. Verser le liquide sirupeux dans un flacon jaugé de 50 cm³. Rincer à plusieurs reprises le ballon de KJELDAHL avec de l'eau distillée. Joindre les eaux de lavage au produit de la destruction : le milieu s'échauffe, le ramener à la température de 15°, puis compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée. Sur une portion aliquote, doser l'ammoniaque par distillation dans l'appareil de PARNAS et WAGNER.

II. Séparation de la caseine. — Méthode de Hoppe-Seyler.

Mesurer 50 cm³ de lait; étendre avec 100 cm³ d'eau distillée; ajouter goutte à goutte de l'acide acétique à 1 p. 100 jusqu'à commencement de précipitation en maintenant une vive agi-

tation. Verser alors 5 cm³ de ce même acide et dans le liquide faire passer durant 30 minutes un courant de gaz carbonique. Compléter le volume à 250 cm³ avec de l'eau distillée. Laisser reposer 12 heures, la caséine seule est ainsi précipitée. Filtrer. Evaporer au bain de sable jusqu'à siccité 25 cm³ du filtrat dans un ballon de KJELDAHL. Détruire la matière organique et doser l'ammoniaque. On obtient ainsi l'azote des matières azotées, autres que la caséine. Par différence avec l'azote total, on a l'azote correspondant à la caséine.

III. — Azote non protéique.

Ajouter à 25 cm³ de lait, 10 cm³ d'acide sulfurique au 1/4 et 15 cm³ de réactif phosphotungstique de FOLIN et DENIS (1). Amener le volume à 200 cm³ avec de l'eau distillée. Après 12 heures de repos, filtrer. Sur une partie aliquote du filtrat, doser l'azote qui représente l'azote non protéique.

La différence entre l'azote restant après précipitation de la caséine et le chiffre ainsi obtenu, fournit ce que nous appellerons « l'azote albuminoïdique » comprenant la lactalbumine, la lactoglobuline et les polypeptides (2).

Par « *Formule Azotée d'un lait* » nous désignerons l'ensemble des constantes :

N total
N de la caséine
N albuminoïdique
N non protéique

déterminées d'après les techniques ci-dessus.

Ayant défini les conditions d'expérience, étudions maintenant l'influence du formol sur la précipitation quantitative des éléments azotés du lait.

(1) Dans un grand matras, verser :

Tungstate de soude.....	100 gr.
Acide phosphorique à 60° B.....	80 cm ³
Eau distillée	800 cm ³

Faire bouillir ce mélange pendant une heure en plaçant un entonnoir dans le col du ballon. Laisser refroidir et compléter le volume de la solution à 1 litre avec de l'eau distillée.

(2) Sur l'existence des polypeptides dans le lait, voir page 41.

I. — CAS DE L'ACIDE ACÉTIQUE

Le lait comme nous l'avons vu, renferme des substances azotées de nature diverse. Leur détermination en présence de doses élevées de formaldéhyde révèle une modification dans leurs proportions relatives.

Sur du lait frais, provenant d'un mélange de plusieurs centaines de litres, nous avons dosé les éléments azotés en suivant la méthode indiquée.

Expérience I

« Formule azotée »

Azote total.....	4 g. 660	par litre
Azote de la caséine....	4 g. 164	—
Azote non protéique...	0 g. 171	—
Azote albuminoïdique..	0 g. 325	—

En centièmes de l'azote total

Azote de la caséine.....	89.35
Azote albuminoïdique.....	6.97
Azote non protéique.....	3.66

Des prises d'essai de 50 cm³ sont respectivement additionnées à froid, de doses progressivement croissantes (2,5-5-10-20 p. 100) de solution de formaldéhyde du Codex, neutralisée et titrée (39 p. 100 de H CHO).

Le temps de contact n'a aucune influence sur le phénomène et la précipitation peut être effectuée à n'importe quel moment, sans que les résultats expérimentaux soient modifiés.

Chacun des laits formolés est alors étendu avec 100 cm³ d'eau distillée, puis additionné d'acide acétique à 1 p. 100 jusqu'à complète précipitation. On fait passer un courant de CO₂ pendant 1/2 heure. On amène à un volume déterminé. On agite. On laisse au repos. On filtre.

Dans ces conditions, on constate que la précipitation pour

INFLUENCE DU FORMOL

être complète, exige des quantités d'acide d'autant plus fortes que les doses de formol sont plus élevées. Le tableau suivant rend compte du retard apporté à la précipitation par la présence du formol :

LAIT	FORMOL p. 100	Nombre de cm ³ d'acide acétique à 1 p. 100 utilisés pour la précipitation complète
50 cm ³	0	15
—	2.5	25
—	5	30
—	10	35
—	20	40

Les quantités d'acide versées sont toujours en léger excès, afin d'assurer la précipitation complète et les chiffres sont intentionnellement arrondis. Il n'y a plus à craindre, en présence du formol, la redissolution du précipité dans un excès d'acide, comme l'ont montré TRILLAT et SAUTON [206].

Dans les filtrats s'écoulant de ces différentes précipitations, l'azote dosé fournit les résultats suivants :

FORMOL p. 100	Azote restant par litre de lait après précipitation par l'acide acétique
0	0 g. 496
2.5	0 g. 381
5	0 g. 355
10	0 g. 348
20	0 g. 274

Ce tableau révèle l'action du formol qui, non seulement insolubilise les matières protéiques, mais encore en rend plus complète la précipitation par les acides. 2,5 p. 100 de formol ont réduit de 23 p. 100 l'azote restant après séparation de la

INFLUENCE DU FORMOL

caséine. Avec des doses plus élevées, la précipitation est encore plus complète. Avec 10 p. 100 de formol, l'azote restant est diminué de 30 p. 100 et il l'est de 45 p. 100, soit de près de la moitié, quand on opère sur du lait formolé à 20 p. 100. Cet entraînement des matières protéiques dû au formol ressort encore plus nettement, lorsqu'on compare les pourcentages d'albumines précipitées dans chacun des cas.

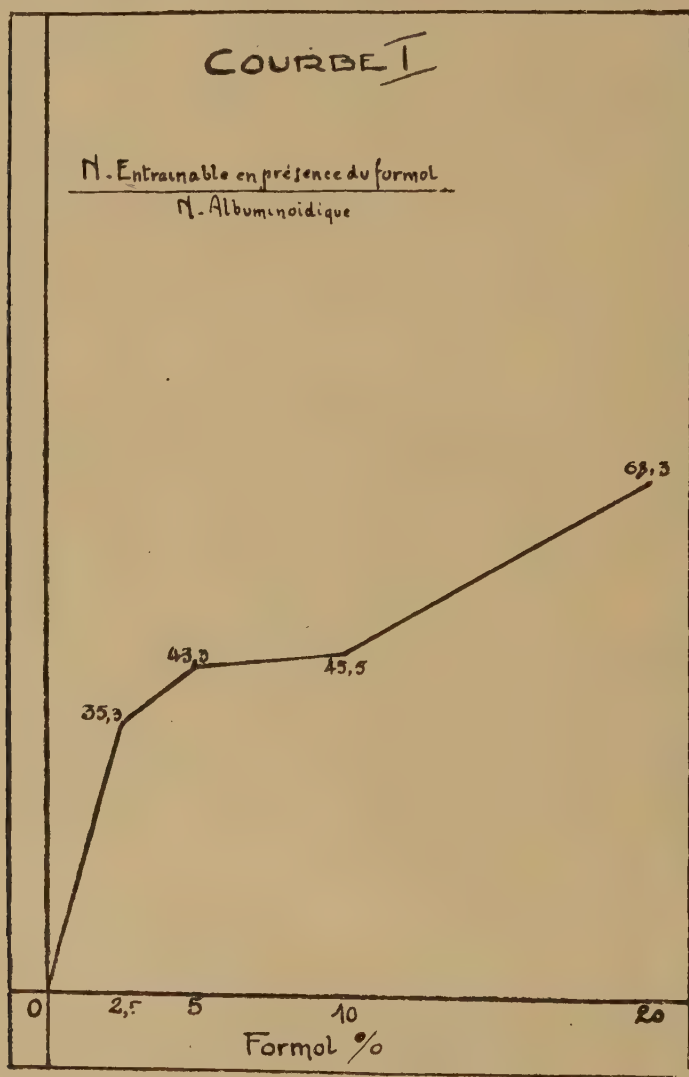
L'azote de la fraction albuminoïdique entraînée en présence du formol est donné par la différence entre l'azote protéique (azote des matières protéiques précipitées par l'acide acétique à 1 p. 100 en présence de formol) et l'azote de la caséine déterminé par la méthode décrite (Hoppe-Seyler).

FORMOL p. 100	AZOTE PROTEIQUE N total — N restant après précipitation par l'acide acétique	Surcharge azotée en présence de Formol
0	4.660 — 0.496 = 4.164	O
2.5	4.660 — 0.381 = 4.279	0 g. 115
5	4.660 — 0.355 = 4.305	0 g. 141
10	4.660 — 0.348 = 4.312	0 g. 148
20	4.660 — 0.274 = 4.386	0 g. 222

Etablissons le rapport de l'N précipité dans chacun des cas à l'N albuminoïdique du lait (soit dans le cas actuel : 0 g. 325).

FORMOL p. 100	RAPPORT	RAPPORT p. 100
2.5	$\frac{0.115}{0.325} = 0.353$	35.3
5	$\frac{0.141}{0.325} = 0.433$	43.3
10	$\frac{0.148}{0.325} = 0.455$	45.5
20	$\frac{0.222}{0.325} = 0.683$	68.3

La proportion d'albumine précipitée, *en surplus de la caséine*, s'élève donc à mesure que croissent les proportions de formol. Sur une courbe le phénomène est aussi frappant. Por-



tons en abscisses les pourcentages de formol et en ordonnées, le rapport précédent. La courbe passe par l'origine puisque le rapport est nul quand on le détermine en l'absence de formol.

II. — CAS DE L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE

Cette expérience a été réalisée sur le même lait en utilisant l'acide trichloracétique au lieu de l'acide acétique comme réactif précipitant de la matière protéique. Nous avons fait usage d'une solution à 2,72 p. 100, moléculairement équivalente à la solution d'acide acétique à 1 p. 100.

Contrairement à ce que l'on observe avec l'acide acétique, le formol aux doses de 2,5 et 5 p. 100 n'apporte pas de retard à la précipitation. C'est seulement lorsqu'on opère sur du lait formolé à 10 et 20 p. 100 qu'on constate une augmentation dans la quantité d'acide trichloracétique nécessaire pour avoir la précipitation complète.

LAIT	FORMOL p. 100	Nombre de cm ³ d'acide trichloracétique à 2,72 p. 100 utilisés pour la précipitation complète
50 cm ³	0	15
—	2,5	15
—	5	15
—	10	20
—	20	20

La précipitation étant effectuée dans chacun des cas, l'azote est dosé dans les filtrats correspondants :

FORMOL p. 100	Azote restant par litre de lait après précipitation par l'acide trichloracétique
0	0 g. 428
2,5	0 g. 361
5	0 g. 332
10	0 g. 325
20	0 g. 239

INFLUENCE DU FORMOL

Le formol agit ici dans le même sens que dans le cas où le réactif précipitant de la matière protéique est l'acide acétique. Avec 2.5 p. 100 de formol, l'azote restant est abaissé de 15 p. 100, et il l'est de 44 p. 100 avec 20 p. 100 de formol.

En comparant les chiffres d'azote restant après précipitation par les acides acétique et trichloracétique, on relève toujours une différence montrant que ce dernier acide a un pouvoir précipitant plus élevé que le premier.

FORMOL p. 100	Azote restant par litre de lait après précipitation par l'acide acétique	Azote restant par litre de lait après précipitation par l'acide trichloracétique	DIFFÉRENCE
0	0 g. 496	0 g. 428	0 g. 068
2.5	0 g. 381	0 g. 361	0 g. 020
5	0 g. 355	0 g. 332	0 g. 023
10	0 g. 348	0 g. 325	0 g. 023
20	0 g. 274	0 g. 239	0 g. 035

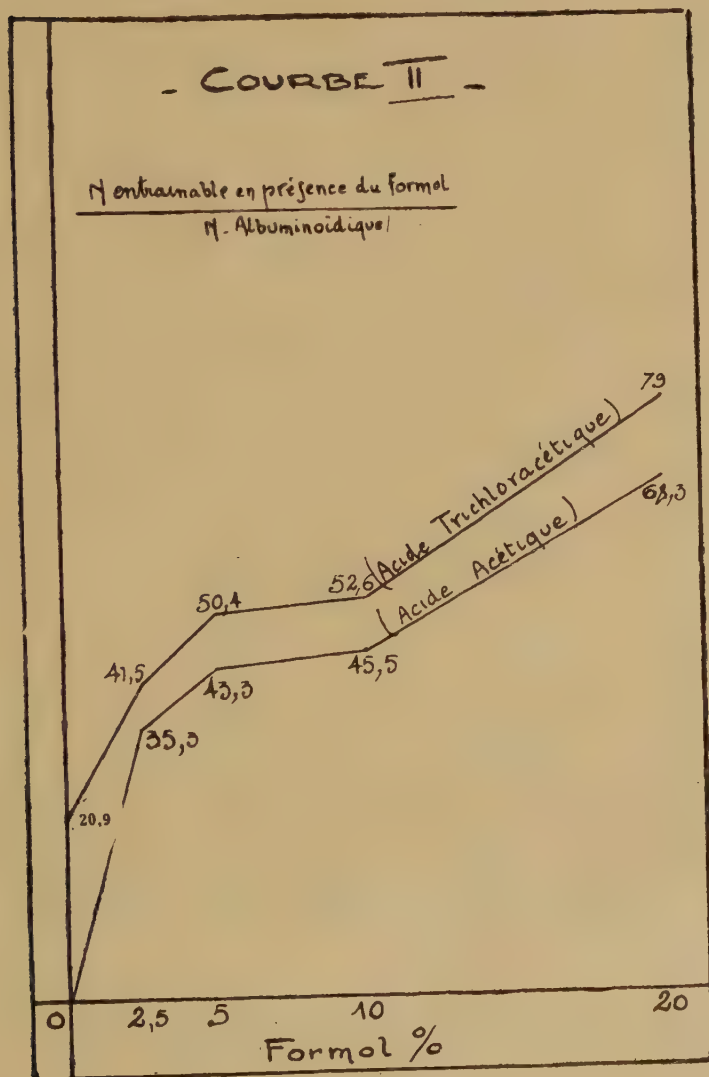
La fraction des albumines dont la précipitation relève du formol s'élève régulièrement à mesure que croît la proportion de formol, sans atteindre toutefois le taux des albumines totales du lait.

FORMOL p. 100	Rapport de l'azote entraînable en présence du formol à l'azote albuminoïdique total du lait	RAPPORT p. 100
2.5	$\frac{0.135}{0.325} = 0.415$	41.5
5	$\frac{0.164}{0.325} = 0.504$	50.4
10	$\frac{0.171}{0.325} = 0.526$	52.6
20	$\frac{0.257}{0.325} = 0.790$	79

Ici, la courbe ne part pas de l'origine, car l'acide trichloracétique précipite non seulement la caséine, mais encore une

petite fraction des albumines proprement dites. Cette fraction est de :

$$\frac{0.068}{0.325} = 0.209 \text{ soit } 20.9 \text{ p. cent.}$$



Expérience II

Nous allons donner les résultats d'une seconde expérience. Les précipitations par les acides acétique et trichloracétique ont porté sur le même lait.

« Formule azotée » :

<i>Azote total</i>	5 g. 355	par litre
<i>Azote de la caséine</i>	4 g. 743	—
<i>Azote non protéique</i> ..	0 g. 201	—
<i>Azote albuminoïdique</i> ..	0 g. 411	—

En centièmes de l'azote total

N de la caséine.....	88.57
N albuminoïdique.....	7.67
N non protéique.....	3.75

Après avoir effectué les précipitations par les acides acétique et trichloracétique, l'azote dosé dans les différents filtrats fournit les résultats suivants :

Formol p. 100	Azote restant par litre de lait après précipitation par l'acide acétique	Azote restant par litre de lait après précipitation par l'acide trichloracétique	DIFFÉRENCE
0	0 g. 612	0 g. 588	0 g. 024
2.5	0 g. 595	0 g. 570	0 g. 025
5	0 g. 523	0 g. 489	0 g. 034
10	0 g. 486	0 g. 449	0 g. 037
20	0 g. 413	0 g. 392	0 g. 021

L'examen de ce tableau montre que les phénomènes suivent une marche absolument parallèle à celle que nous avons décrite : à mesure que la proportion de formol augmente, l'azote restant diminue.

Déterminons la fraction de l'azote albuminoïdique précipité en surplus de la caséine, dans chacun des cas :

INFLUENCE DU FORMOL

Formol p. 100	ACIDE ACÉTIQUE		Surcharge azotée en présence de formol	ACIDE TRICHLORACÉTIQUE		Surcharge azotée en présence de formol
	Azote Formol	Le Formol agit préférentiellement sur l'azote ou l'acide		Azote Formol	Le formol agit préférentiellement sur l'acide ou le formol	
0	5.355 — 0.012 = 5.343		0	5.355 — 0.588 = 4.767		0 g. 024
2.5	5.355 — 0.505 = 4.850		0 g. 017	5.355 — 0.570 = 4.785		0 g. 042
5	5.355 — 0.523 = 4.832		0 g. 089	5.355 — 0.689 = 4.666		0 g. 123
10	5.355 — 0.636 = 4.719		0 g. 126	5.355 — 0.649 = 4.706		0 g. 163
20	5.355 — 0.874 = 4.481		0 g. 166	5.355 — 0.982 = 4.373		0 g. 220

Représentons le rapport de la surcharge azotée en présence du formol à l'azote à l'acide trichloracétique du lait (soit dans le cas présent : 0 g. 411).

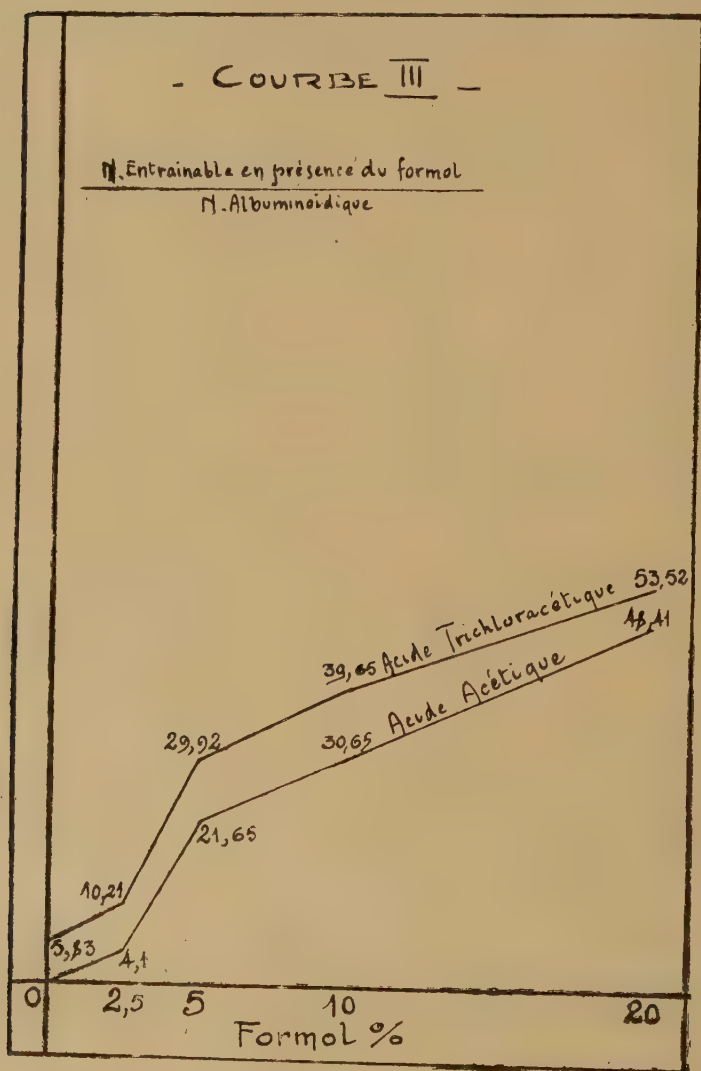
Formol p. 100	RAPPORT p. 100 (Acide acétique)	RAPPORT p. 100 (Acide trichloracétique)
2.5	$\frac{0.017}{0.411} \times 100 = 4.13$	$\frac{0.042}{0.411} \times 100 = 10.21$
5	$\frac{0.089}{0.411} \times 100 = 21.65$	$\frac{0.123}{0.411} \times 100 = 29.92$
10	$\frac{0.126}{0.411} \times 100 = 30.65$	$\frac{0.163}{0.411} \times 100 = 39.65$
20	$\frac{0.166}{0.411} \times 100 = 40.41$	$\frac{0.220}{0.411} \times 100 = 53.52$

Représentons graphiquement les phénomènes sur deux axes de coordonnées rectangulaires : portons en abscisses le pourcentage de formol et en ordonnées la valeur p. 100 des rapports déterminés dans le cas de l'acide acétique et de l'acide trichloracétique.

La courbe due à l'acide acétique passe par l'origine des axes, tandis que celle due à l'acide trichloracétique commence seulement à l'ordonnée :

$$\frac{0.024}{0.411} \times 100 = 5.83$$

L'acide trichloracétique, en effet, précipite non seulement la caséine, mais encore une fraction des albumines vraies.



III. — CAS DE L'ACIDE LACTIQUE

Nous avons étudié l'influence du formol sur la précipitation des protéines, en utilisant l'acide lactique comme réactif précipitant. Nous avons fait usage d'une solution à 1.50 p. 100 d'acide lactique pur, moléculairement équivalente à la solution d'acide acétique à 1 p. 100 précédemment utilisée.

« Formule azotée » :

<i>N total</i>	5 g. 753
<i>N de la caséine</i>	4 g. 887
<i>N albuminoïdique</i>	0 g. 675
<i>N non protéique</i>	0 g. 191

en centièmes de l'azote total

<i>N de la caséine</i>	84.94 p. 100
<i>N albuminoïdique</i>	11.73 p. 100
<i>N non protéique</i>	3.32 p. 100

Ici aussi, nous avons constaté un retard à la précipitation d'autant plus prononcé que la proportion de formol est plus élevée :

LAIT	FORMOL p. 100	Nombre de cm ³ d'acide lactique à 1.50 p. 100 utilisés pour la précipitation complète
50 cm ³	0	20
—	5	25
—	10	30
—	20	30

Nous avons aussi traité par l'acide acétique du lait simple et du lait formolé à 20 et 50 p. 100. Une fois les précipitations

respectivement effectuées, l'azote dosé dans les filtrats fournit les résultats suivants :

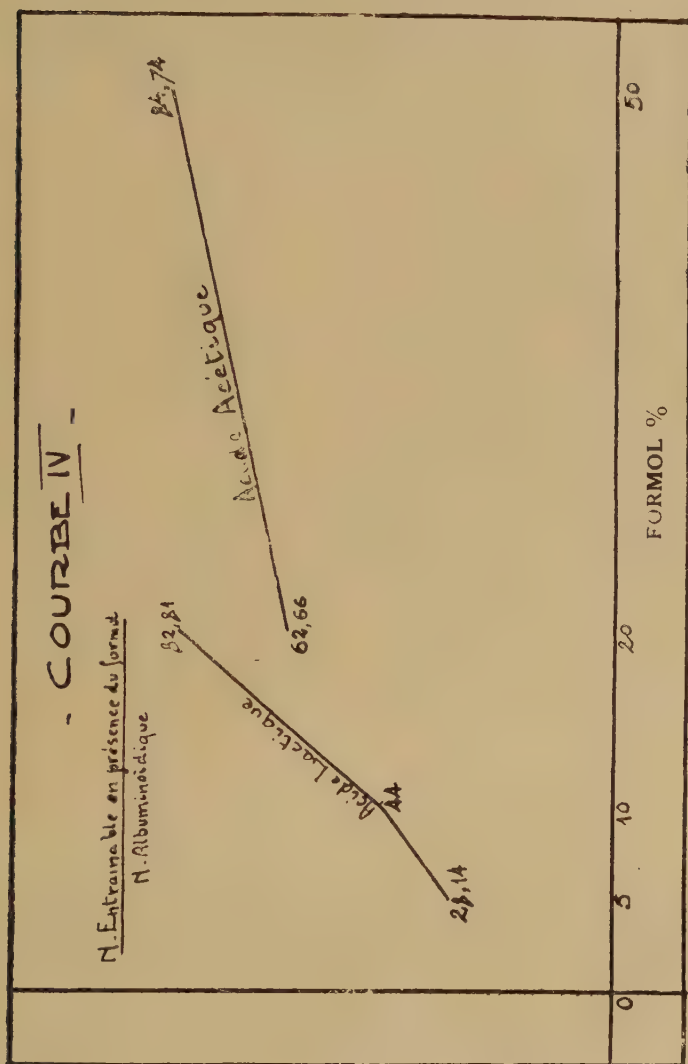
FORMOL p. 100	N restant par litre de lait après précipitation par l'acide lactique	N restant par litre de lait après précipitation par l'acide acétique
0	0 gr. 930	0 gr. 866
5	0 gr. 676	
10	0 gr. 569	
20	0 gr. 307	0 gr. 443
50		0 gr. 294

Ce tableau montre une fois de plus que le formol agit toujours dans le sens d'une précipitation plus complète des protéines. L'acide lactique précipite bien la caséine; mais le moindre excès suffit pour redissoudre des quantités appréciables de caséine.

Etablissons maintenant les rapports de l'azote albuminoïdique entraînable en présence du formol à l'azote albuminoïdique du lait :

FORMOL p. 100	RAPPORT p. 100 (acide lactique)	RAPPORT p. 100 (acide acétique)
5	$\frac{0.190 \times 100}{0.675} = 28.14$	
10	$\frac{0.297 \times 100}{0.675} = 44$	
20	$\frac{0.559 \times 100}{0.675} = 82.81$	$\frac{0.423 \times 100}{0.675} = 62.66$
50		$\frac{0.572 \times 100}{0.675} = 84.74$

Comme précédemment, représentons ces résultats par des courbes.



IV. — CAS DE L'ACIDE CITRIQUE

Comme réactif précipitant de la matière protéique, nous avons utilisé une solution d'acide citrique à 3.50 p. 100 moléculairement équivalente à la solution d'acide acétique à 1 p. 100.

« Formule azotée »

<i>N total</i>	5 g. 253 par litre
<i>N de la caséine</i>	4 g. 251 —
<i>N albuminoïdique</i>	0 g. 816 —
<i>N non protéique</i>	0 g. 186 —

En centièmes de l'azote total

<i>N de la caséine</i>	80.92 p. 100
<i>N albuminoïdique</i>	15.53 p. 100
<i>N non protéique</i>	3.54 p. 100

Ici encore, nous avons constaté un retard à la précipitation en présence de doses croissantes de formaldéhyde :

LAIT	FORMOL p. 100	Nombre de cm ³ d'acide citrique à 3.50 p. 100 utilisés pour la précipitation complète
50 cm ³	0	8
—	5	10
—	10	15
—	20	20

Afin de comparer le pouvoir précipitant des différents acides en présence du formol, nous avons traité du lait simple et du lait formolé :

- 1° Par l'acide citrique à 3.50 p. 100.
- 2° Par l'acide acétique à 1 p. 100.
- 3° Par l'acide trichloracétique à 2.72 p. 100.
- 4° Par l'acide lactique à 1.50 p. 100.

INFLUENCE DU FORMOL

Une fois les précipitations effectuées, les dosages de l'azote dans les différents filtrats ont fourni les résultats suivants :

Formol p. 100	N restant par litre de lait après précipitation par l'acide citrique	N restant par litre de lait après précipitation par l'acide acétique	N restant par litre de lait après précipitation par l'acide trichloracétique	N restant par litre de lait après précipitation par l'acide lactique
0	0 g. 916	1 g. 002	0 g. 810	1 g. 015
5	0 g. 786			
10	0 g. 716			
20	0 g. 641	0 g. 456	0 g. 399	0 g. 335

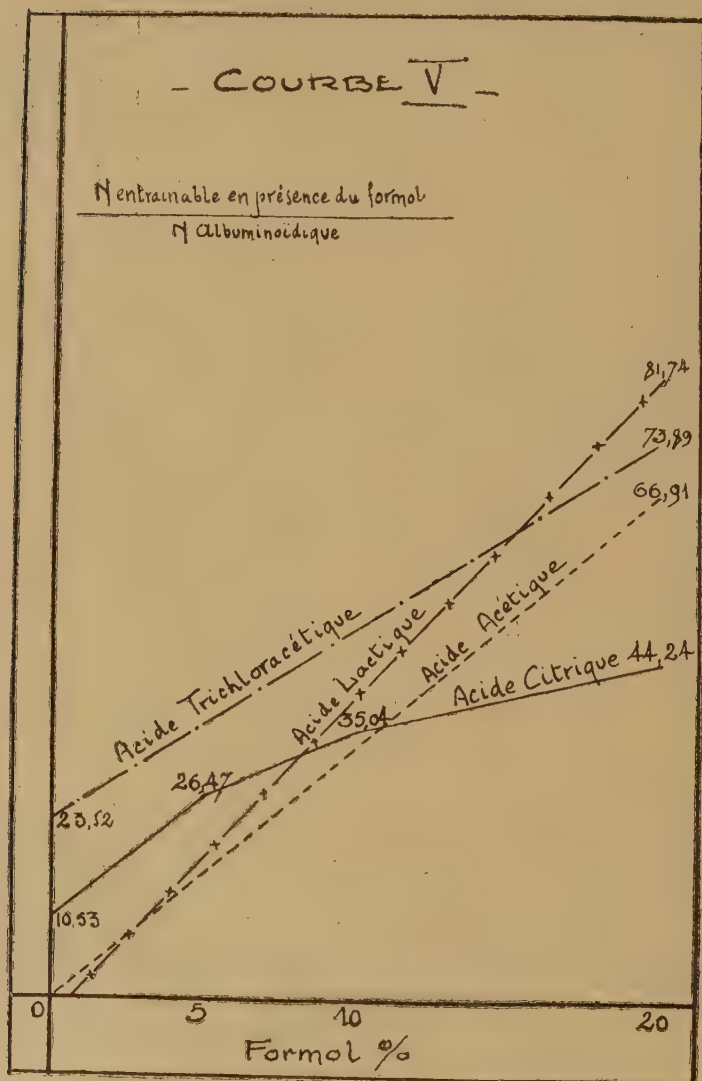
Le formol, dans le cas où le réactif précipitant est l'acide citrique, agit donc dans le même sens que précédemment. Etablissons les rapports de la fraction des albumines entraînables en présence du formol aux albumines totales du lait et représentons le phénomène sur un graphique :

FORMOL p. 100	RAPPORT p. 100 (Acide citrique)
5	$\frac{0.216 \times 100}{0.816} = 26.47$
10	$\frac{0.286 \times 100}{0.816} = 35.04$
20	$\frac{0.361 \times 100}{0.816} = 44.24$

L'acide citrique précipite en plus de la caséine une petite fraction des albumines du lait. La courbe partira donc de l'ordonnée :

$$\frac{0.086 \times 100}{0.816} = 10.53 \quad (1)$$

(1) Nous avons établi directement, sans les expliciter, les rapports dus aux acides acétique, trichloracétique et lactique.



CONCLUSION

La figure 5 résume les résultats des expériences décrites dans ce chapitre. Chacune des courbes traduit l'augmentation régulière du rapport :

Azote entraînable en présence du formol

Azote albuminoïdique

en fonction de la proportion de formol ajoutée.

La marche du phénomène est donc indépendante de la nature de l'acide utilisé. Celle-ci n'intervient que pour déterminer le point de départ et la pente de la courbe.

La courbe due à l'acide trichloracétique est au-dessus de celle due à l'acide acétique, en accord avec ce que l'on sait du pouvoir précipitant plus étendu de cet acide.

La courbe due à l'acide lactique met en évidence la grande solubilité de la caséine dans cet acide. Ce dernier la précipite bien, mais le moindre excès en dissout des quantités appréciables.

Ces observations sur l'augmentation de l'azote précipité en présence de doses croissantes de formol confirment celles qui ont été faites d'autre part en même temps que les nôtres par MASCRÉ et HERBAIN [125] sur divers sérums.

CHAPITRE II

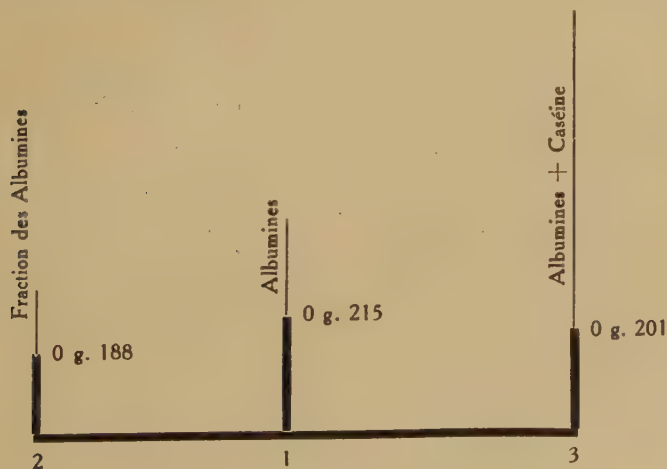
Analyse des phénomènes observés Libération d'acidité due au formol

Nous nous sommes demandé si ce pouvoir précipitant spécifique du formol porte uniquement sur les albumines du lait, ou si pour une petite part il intéresse l'azote résiduel.

Pour cela, sur les filtrats qui s'écoulent de la précipitation par l'acide acétique, du lait simple et du lait formolé à 20 p. 100, effectuons une désalbumination phosphotungstique. Les résultats sont les suivants :

Précipitation par l'acide phosphotungstique du :

	N. restant par litre
1° Filtrat acétique simple.....	0 g. 215
2° Filtrat acétique formolé à 20 p. 100.....	0 g. 188
3° Lait directement	0 g. 201



Ces chiffres présentent des différences assez faibles qui nous permettraient seulement d'en retenir un sens.

L'influence du formol sur la précipitation quantitative des matières azotées du lait est donc bien établie.

On admet (Hoppe-Seyler) que l'acide acétique et CO^2 dans les conditions précédemment définies, précipitent seulement la caséine. En présence de formol, on doit admettre que l'acide acétique précipite non seulement la caséine mais encore une fraction plus ou moins grande des albumines vraies (lactalbumine + lactoglobuline). Le précipité doit aussi entraîner une petite quantité de composés constituant l'azote résiduel non protéique (acides aminés, urée), probablement par adsorption.

Ainsi s'expliqueraient les légères différences, constatées en comparant les résultats de la désalbumination phosphotungstique, effectuée sur les filtrats acétiques, provenant de lait simple et formolé.

Il est à penser que ce phénomène d'adsorption porte surtout sur les acides aminés avec lesquels le formol se combine suivant la réaction classique :



Ce remplacement dans NH^2 de H^2 par CH^2 doit faire disparaître le caractère amphotère de l'amino-acide et mettre en liberté une certaine acidité, qu'il est possible de titrer.

STEINEGGER [193] a montré que l'acidité du lait croît avec la proportion de formol et pour une dose de 5 p. 100 en général, atteint un maximum jamais dépassé.

Ci-dessous, nous donnons les résultats de quelques expériences, montrant de quel ordre peut être cette augmentation maximum.

L'acidité a toujours été prise sur le lait non dilué. SOLDNER, en 1888, a en effet signalé que l'addition d'eau au lait diminuait notablement son degré d'acidité :

Mode opératoire : Dans 20 cm³ de lait verser deux gouttes de solution alcoolique de phénolphtaleïne à saturation et de la soude N/10 jusqu'à virage.

ANALYSE DES PHENOMENES OBSERVES

Acidité du lait exprimée en grammes d'acide lactique par litre	Acidité maximum obtenue après addition de formol neu- tralisé au même lait (en gr. d'ac. lact. par litre)	Augmentation p. 100
1 g. 74	3 g. 22	85
1 g. 50	2 g. 84	89
1 g. 62	3 g. 24	100
1 g. 48	3 g. 07	107,4

Nous avons conclu de nos expériences que le formol possède un pouvoir précipitant sur une fraction azotée bien déterminée du lait. En conséquence, l'addition de formol neutralisé à du lactosérum devrait provoquer une précipitation; cependant il n'en est rien et ce, quelle que soit la quantité de formol ajoutée. Cette remarque est en accord avec ce fait qu'il est indispensable pour observer les phénomènes décrits, de verser dans le lait le formol *avant* le réactif précipitant. Lorsqu'on ajoute au lait le formol d'abord, *puis* l'acide, on obtient un chiffre d'azote restant inférieur à celui que donne la précipitation par l'acide employé seul; si l'on ajoute d'abord l'acide, *puis* le formol, on n'observe pas d'écart sensible avec le chiffre obtenu par la seule défécation acide. Cette remarque s'applique non seulement au lait, mais aux sérums sanguins, ainsi que l'ont montré MASCRÉ et HERBAIN [125].

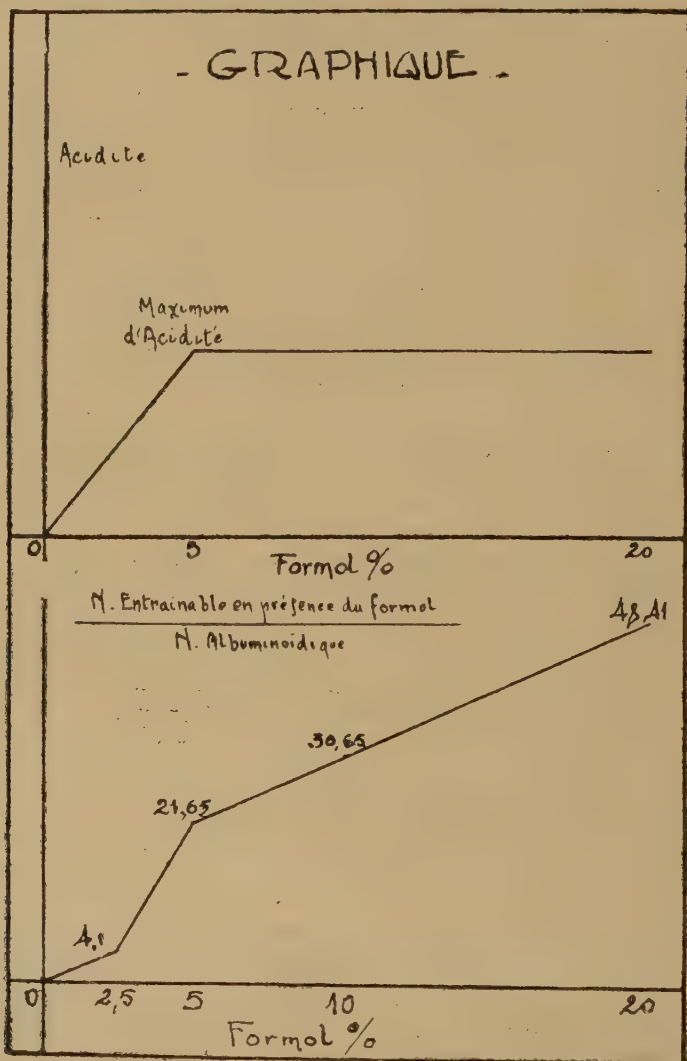
Le formol modifie physiquement les protéines : la caséine formolée n'est plus soluble dans les alcalis, par exemple. Il les modifie aussi chimiquement; le fait est mis en évidence par la libération d'acidité. Dès lors, n'est-on pas en droit de confondre ce que nous avons reconnu comme pouvoir précipitant spécifique du formol avec des propriétés intrinsèques de la matière albuminoïde formolée?

Nous ne le pensons pas, car si les doses de formol de plus en plus élevées augmentent sans cesse l'acidité du lait (action chimique), un maximum est atteint pour une proportion de 5 p. 100 et n'est jamais dépassé (ce maximum constitue le chiffre ou l'indice d'aldéhyde de STEINEGGER.). Tandis que la fraction des éléments azotés du lait précipitable par les acides croît proportionnellement au formol ajouté, sans jamais atteindre de limite.

Nous avons vérifié que les doses de 25, 30, 40 et 50 p. 100 de

formol agissent, et de plus en plus nettement, à mesure que les doses s'élèvent, dans le sens précédemment indiqué.

Nous avons donc affaire à deux actions de caractère différent, ainsi qu'il ressort des deux courbes suivantes :



A la limite, la précipitation des protéines du lait par les acides en présence de doses de plus en plus élevées de formol, se rapproche de la désalbumination phosphotungstique.

CHAPITRE III

Essai explicatif des phénomènes observés

Nous avons tenté une explication des phénomènes observés en faisant porter l'action du formol, non plus sur le lait milieu très complexe, mais sur un mélange défini de protéines. A cet effet, nous avons fait usage de caséine pure préparée au laboratoire.

Caséine

Préparation :

Dans un cristalliseur d'une contenance de 4 à 5 litres, verser un litre de lait et autant d'eau distillée. Faire tomber goutte à goutte de l'acide acétique N jusqu'à commencement de précipitation, en ayant soin d'agiter sans cesse le mélange à l'aide d'une spatule en bois.

A ce moment, laisser couler toujours goutte à goutte et en agitant vigoureusement, un volume d'acide égal au $1/10^e$ de celui déjà versé. En général, il faut de 90 à 100 cm³ d'acide acétique N pour coaguler un litre de lait.

Faire passer dans le mélange un courant rapide d'anhydride carbonique pur pendant 30 minutes. La caséine se sépare en flocons très divisés entraînant le beurre et les sels insolubles. Laisser reposer 2 heures. Filtrer sur trompe. Laver soigneusement à l'eau distillée (3 à 4 litres) en ayant soin de délayer chaque fois complètement le précipité dans l'eau de lavage, afin de lui conserver un grain très fin.

Introduire ce précipité dans un récipient contenant 2 à 3 litres de solution de lessive de soude à 1 0/00. La caséine se

dissout lentement laissant surnager la matière grasse. Filtrer. Additionner le liquide écoulé d'acide acétique jusqu'à précipitation complète de la caséine. Filtrer. Laver abondamment. Recommencer 4 à 5 fois ces deux opérations : dissolution de la caséine dans la soude diluée et précipitation par l'acide acétique.

Après lavage final, la caséine est traitée par l'alcool à 96° (deux ou trois fois), puis par l'éther anhydre. Elle est mise à sécher dans le vide sulfurique.

Caractères :

Elle se présente sous forme d'une poudre blanche laissant de 0.30 à 0.45 p. 100 de cendres à la calcination au four à moufle pendant quatre heures.

Pouvoir rotatoire :

Les différentes caséines que nous avons préparées nous ont fourni comme valeur moyenne du pouvoir rotatoire spécifique :

1° En solution dans l'acétate de potassium à 5 p. 100 : (1)

$$[\alpha]_D = -82.10.$$

2° En solution alcaline (2) :

$$-115^\circ < [\alpha]_D < -130^\circ.$$

Azote et phosphore :

Pour purifier la caséine et la débarrasser d'une partie des lipides et des sels qu'elle contient encore, nous l'avons épuisée par l'alcool à 95° bouillant, pendant 10 heures environ, dans un appareil à extraction continue de KUMAGAWA et SUTO. Ce traitement lui a fait perdre 0.316 p. 100 de son poids.

Sur différentes prises d'essai, nous avons fait des micro-Kjeldahls. L'ammoniaque a été dosée par distillation dans l'appareil de PARNAS et WAGNER. Les chiffres extrêmes trouvés pour le pourcentage d'azote ont été :

15.45 et 15.81

(1) Voir note 1 page 13.

(2) Voir note 2 page 13.

La moyenne de nos résultats est 15.67 p. 100, ce qui donne 6.38 comme coefficient azotométrique de la caséine.

La teneur moyenne en phosphore (dosé par la méthode de COPAUX en suivant la technique de P. FLEURY de nos différentes caséines est 0.810 p. 100.

Sérine — Globuline

Pour réaliser synthétiquement l'ensemble des protéines du lait, il nous fallait encore de la lactalbumine et de la lactoglobuline. Vu leur étroite ressemblance, sinon leur identité avec la sérine et la globuline du sérum sanguin, nous avons fait usage d'un mélange de ces deux albumines, préparé en appliquant la méthode à l'acétone.

Technique :

Placer dans un bain glacé du sérum sanguin préalablement refroidi. Le précipiter par 2 fois 1/2 son volume d'acétone refroidie vers 0°. Laisser 10 minutes en contact toujours dans le bain glacé. Filtrer sur trompe en agitant continuellement avec une spatule recourbée pour éviter les grumeaux. Laver avec de l'acétone glacée, puis avec de l'éther. Dessécher à la trompe; on obtient ainsi une poudre blanche, constituée par le mélange sérine-globuline.

Peptone

Nous avons utilisé de la peptone « Roche » qui est obtenue par digestion pancréatique de la caséine. Cette peptone est riche en acides aminés libres, notamment en tryptophane.

Ayant dès lors à notre disposition des protéines définies, nous avons — pour décomposer les phénomènes observés — fait porter successivement l'action du formol sur les mélanges suivants :

1° Caséine + Sérine-Globuline.

2° Caséine + Peptone.

I. — CASEINE + « SERINE-GLOBULINE »

EXPÉRIENCE I

Nous avons dissous de la caséine, puis du mélange « Sérine-Globuline » dans de l'eau de chaux, en proportions assez voisines de celles existant dans le lait.

Sur cet ensemble bien homogénéisé par agitation nous avons dosé l'azote total, soit 3 g. 618 par litre.

Sur une portion aliquote, nous avons précipité la caséine par de l'acide acétique N/2. L'azote restant dans le filtrat correspond à l'azote albuminoïdique, soit 0 g. 627 par litre, sensiblement la quantité que nous avions introduite (0 g. 620).

Des prises d'essai identiques du mélange protéique ont été additionnées de doses croissantes de formol neutralisé (2,5 — 5 — 10 — 20 p. 100). Dans chacune d'elles, nous avons versé de la solution N/2 d'acide acétique, jusqu'à précipitation complète. Nous avons amené à un volume connu, puis après repos, filtré et dosé l'azote dans les filtrats :

RESULTATS

FORMOL p. 100	AZOTE RESTANT en grammes par litre
0	0.627
2.5	0.200
5	0.201
10	0.210
20	0.203

Les chiffres d'azote restant dans les filtrats sont très comparables et oscillent autour de 0.203; les petites différences observées sont compatibles avec les erreurs d'expériences. Donc, comme dans le cas du lait, le formol favorise la précipitation d'une quantité d'azote protéique beaucoup plus grande. Calculons le pourcentage d'albumine (sérine-globuline) entraînable en présence du formol :

$$\frac{(0.627-0.203) \times 100}{0.627} = 67.62 \text{ p. 100}$$

soit plus de la moitié de l'azote albuminoïdique. Cependant, à mesure que croît la proportion de formol, il n'y a pas augmentation progressive de la quantité d'albumine entraînée, et ce, contrairement à nos observations sur le lait. De plus, dans cette expérience, l'entraînement maximum est de suite atteint. Il devient donc intéressant d'étudier l'allure du phénomène, pour des doses de formol inférieures à 2,50 p. 100.

EXPÉRIENCE II

Nous avons préparé :

1° Une solution de caséine dans l'eau de chaux. Elle contenait 3 g. 57 d'azote par litre.

2° Une solution d'albumine dans l'eau de chaux. Elle contenait 2 g. 80 d'azote par litre.

Nous avons mélangé 200 cm³ de la solution de caséine avec 50 cm³ de la solution d'albumine.

Sur 1 cm³ du mélange, nous avons dosé l'azote et avons trouvé : 3 g. 42 par litre (chiffre théorique calculé : 3 g. 416).

Nous avons mesuré 25 cm³ du mélange ainsi préparé, dans 9 fioles jaugées de 50 cm³. Dans sept d'entre elles, nous avons ajouté du formol neutralisé (solution à 39 p. 100) dans les proportions suivantes :

0.312 — 0.625 — 1.25 — 2.50 — 5 — 10 — 20 p. 100.

puis nous les avons abandonnées au repos pendant 2 heures. Dans chacune des neuf fioles, nous avons versé, tout en agitant, d'abord 10 cm³ d'eau distillée pour diluer, puis goutte à goutte de l'acide acétique N/2 jusqu'à complète précipitation. Nous avons amené les volumes à 50 cm³ avec de l'eau distillée et filtré après une heure de repos. Sur une portion aliquote du filtrat, après évaporation et destruction sulfurique, nous avons dosé l'azote résiduel. Voici les résultats :

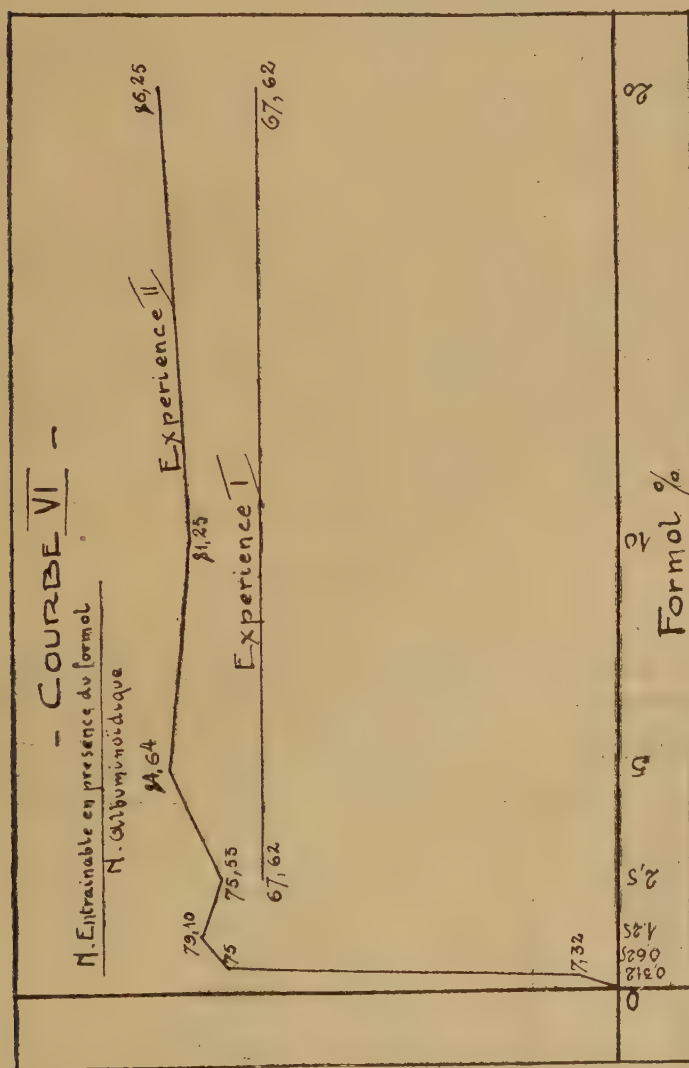
ESSAI EXPLICATIF DES PHÉNOMÈNES OBSERVÉS

FORMOL p. 100	AZOTE RESTANT APRÈS PRÉCIPITATION PAR L'ACIDE ACÉTIQUE (en grammes par litre)
0	0.560
0.312	0.519
0.625	0.140
1.25	0.117
2.50	0.137
5	0.086
10	0.105
20	0.077

Le chiffre d'azote restant après séparation de la caséine, 0.560, est exactement celui fourni par le calcul. L'examen du tableau nous montre de façon saisissante l'action du formol, tant à partir de 2,50 p. 100 comme précédemment, que pour des doses moins élevées : 1.25, 0.625, 0.312 p. 100. Établissons le rapport de la fraction albuminoïdique dont la précipitation relève du formol, à l'azote albuminoïdique total. Celle-là s'obtient en retranchant de 0.560 les nombres du tableau précédent.

FORMOL p. 100	RAPPORT p. 100
	0.041×100
0.312	$\frac{0.560}{0.420 \times 100} = 7.32$
	0.560
0.625	$\frac{0.443 \times 100}{0.560} = 75$
	0.560
1.25	$\frac{0.423 \times 100}{0.560} = 79.10$
	0.560
2.5	$\frac{0.474 \times 100}{0.560} = 75.53$
	0.560
5	$\frac{0.455 \times 100}{0.560} = 84.64$
	0.560
10	$\frac{0.483 \times 100}{0.560} = 81.25$
	0.560
20	$\frac{0.483 \times 100}{0.560} = 86.25$
	0.560

Représentons sur un graphique les phénomènes observés. Portons en abscisses le pourcentage de formol et en ordonnées le rapport précédent.



En l'absence de formol, l'acide acétique sépare uniquement la caséine; en sa présence, il y a en plus de la caséine, précipitation d'une fraction importante mais variable des albumines sériques. Nous allons rapporter maintenant deux expériences, calquées exactement sur les précédentes, et s'en distinguant par le fait pour le moins inattendu que l'addition d'acide acétique au mélange « Caséine+Sérine-Globuline » en l'absence de formol, précipite non seulement la caséine, mais encore une fraction des albumines sériques et ce, par entraînement très vraisemblablement.

EXPÉRIENCE III

La solution de caséine contenait 3 g. 99 d'azote par litre, la solution d'albumine 1 g. 89. Nous avons mélangé 200 cm³ de la première avec 50 de la seconde. L'azote total, dosé sur 1 cm³ donne 3 g. 57, soit le chiffre calculé.

Après précipitation par l'acide acétique (en l'absence de formol), l'azote restant par litre dans le filtrat est de 0 g. 0991 au lieu de 0 g. 378 (fourni par le calcul). Il y a donc eu entraînement d'une fraction importante des albumines par le précipité de caséine. Calculons-là :

$$\begin{array}{r} 0.378 - 0.0991 = 0.2789 \\ \hline 0.378 \end{array} = 73.78 \text{ p. } 100$$

En présence de formol, les chiffres d'azote restant sont nettement diminués, comme dans les expériences précédentes :

FORMOL p. 100	AZOTE RESTANT APRÈS PRÉCIPITATION PAR L'ACIDE ACÉTIQUE (en grammes par litre)
0	0.0991
0.312	0.0812
0.625	0.0990
1.25	0.0828
2.5	0.0574
5	0.0616
10	0.0532
20	0.0518

Etablissons les rapports de l'azote albuminoïdique dont la précipitation relève du formol à l'azote albuminoïdique trouvé expérimentalement (0.0991) et non à l'azote albuminoïdique total, comme nous l'avons fait jusque-là, puisque l'acide acétique a déterminé la précipitation de 73.78 p. 100 des albumines sériques en plus de la caséine.

FORMOL p. 100	RAPPORT p. 100
0.312	$\frac{0.0179 \times 100}{0.0991} = 18.06$
0.625	$\frac{0.0001 \times 100}{0.0991} = 0$
1.25	$\frac{0.0163 \times 100}{0.0991} = 16.44$
2.5	$\frac{0.0417 \times 100}{0.0991} = 42.07$
5	$\frac{0.0375 \times 100}{0.0991} = 37.84$
10	$\frac{0.0459 \times 100}{0.0991} = 46.31$
20	$\frac{0.0473 \times 100}{0.0991} = 47.72$

EXPÉRIENCE IV

La solution de caséine contenait 3 g. 85 d'azote par litre et celle d'albumine 3 g. 225. Nous avons réalisé le mélange habituel : 200 cm³ de solution de caséine avec 50 cm³ de celle d'albumine. Après précipitation par l'acide acétique N/2, en l'absence de formol, l'azote restant est de : 0 g. 254 par litre au lieu de 0 g. 645 (chiffre théorique). Ici encore, la précipitation s'est compliquée de celle d'une fraction albuminoïdique importante (par adsorption, semble-t-il)

$$\begin{aligned} &0.645 - 0.254 = 0.391 \\ &\frac{0.391 \times 100}{0.645} = 60.62 \text{ p. 100} \end{aligned}$$

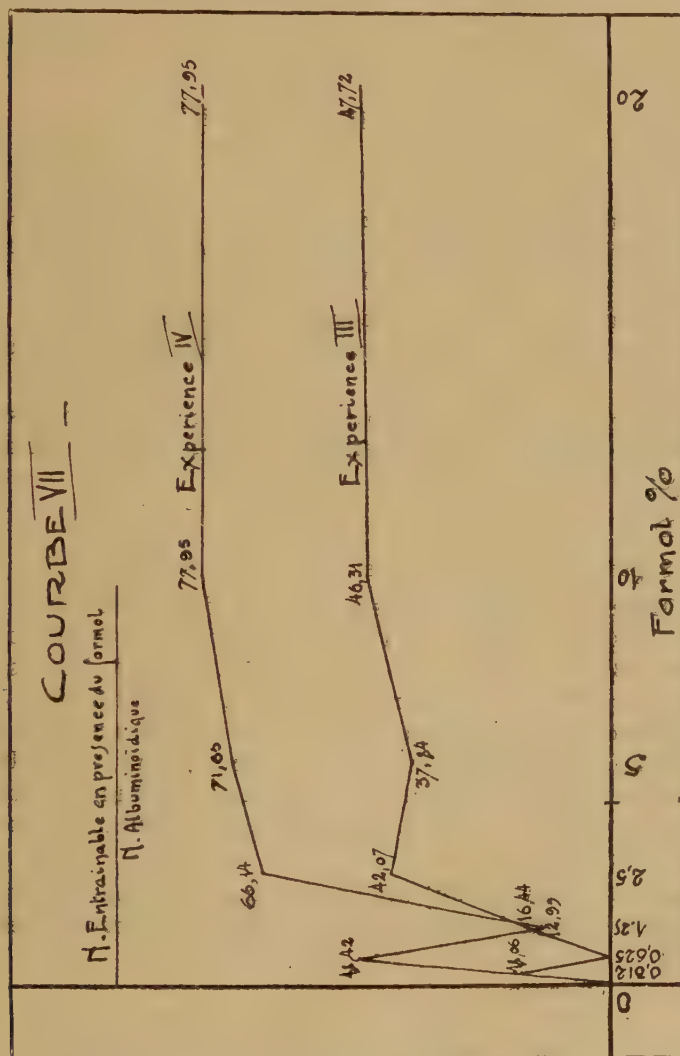
En présence de formol les chiffres d'azote restant sont nettement abaissés :

FORMOL p. 100	AZOTE RESTANT APRÈS PRÉCIPITATION PAR L'ACIDE ACÉTIQUE (en grammes par litre)
0	0.254
0.625	0.131
1.25	0.221
2.5	0.086
5	0.072
10	0.056
20	0.056

L'acide acétique désalbumine presque totalement les mélanges formolés à 10 et 20 p. 100, puisqu'on ne retrouve plus que 0 g. 056 d'azote par litre. Etablissons les rapports de l'azote dont la précipitation relève du formol à l'azote albuminoïdique déterminé en l'absence de formol, par simple précipitation par l'acide acétique.

FORMOL p. 100	RAPPORT p. 100
0.625	$\frac{0.123 \times 100}{0.254} = 48.42$
1.25	$\frac{0.033 \times 100}{0.254} = 12.99$
2.5	$\frac{0.168 \times 100}{0.254} = 66.14$
5	$\frac{0.182 \times 100}{0.254} = 71.65$
10	$\frac{0.198 \times 100}{0.254} = 77.95$
20	$\frac{0.198 \times 100}{0.254} = 77.95$

Concrétisons sur un graphique, les phénomènes que nous venons de décrire dans les expériences III et IV.



En conclusion, quel que soit le quantum d'azote précipité par l'acide seul, le mélange « Acide + Formol » agit toujours dans le sens d'une précipitation plus complète de l'azote protéique.

II. — CASEINE + PEPTONE

Préparer une solution de caséine dans de l'eau de chaux (à 25 g. par litre environ). Sur 1 cm³ doser l'azote après destruction sulfurique. Rapporter au litre.

Préparer une solution aqueuse de peptone à 18-20 g. par litre. Déterminer comme précédemment la quantité d'azote par litre.

Prélever une portion aliquote de chacune de ces deux solutions. Les mélanger soigneusement. Effectuer sur le mélange les opérations suivantes :

1° Dosage de l'azote total (sur 1 cm³).

2° Séparation de la caséine par l'acide acétique N/2.

3° Mesurer plusieurs prises d'essai identiques dans des fioles jaugées. Y ajouter du formol neutralisé (solution à 39 p. 100) en proportion croissante. Laisser 2 heures au repos. Après légère dilution, verser goutte à goutte dans chacun des liquides, tout en agitant, de l'acide acétique N/2 jusqu'à complète précipitation. Amener à un volume connu. Laisser reposer. Filtrer. Evaporer une quantité déterminée du filtrat. Minéraliser à l'aide du mélange de « GUNNING » ou de « FLEURY ». Doser l'azote.

Rapportons, en suivant le plan devenu maintenant familier, trois de nos expériences. Nous interpréterons ensuite les résultats.

EXPÉRIENCE I

Azote total	4 g. 620 par litre
Azote de la caséine.....	3 g. 878 —
Azote restant après séparation de la caséine	
(azote de la peptone).....	0 g. 742 —

FORMOL p. 100	Azote restant après précipitation par l'acide acétique	Azote de la peptone entraînable en présence du formol	Rapport p, 100 de l'azote entraînable en présence du formol à l'azote de la peptone
0	0.742		
1.25	0.703	$0.742 - 0.703 = 0.039$	$\frac{0.039 \times 100}{0.742} = 5.25$
2.50	0.689	$0.742 - 0.689 = 0.053$	$\frac{0.053 \times 100}{0.742} = 7.14$
5	0.672	$0.742 - 0.672 = 0.070$	$\frac{0.070 \times 100}{0.742} = 9.43$
10	Manqué	Manqué	Manqué
20	0.623	$0.742 - 0.623 = 0.119$	$\frac{0.119 \times 100}{0.742} = 16.03$

EXPÉRIENCE II

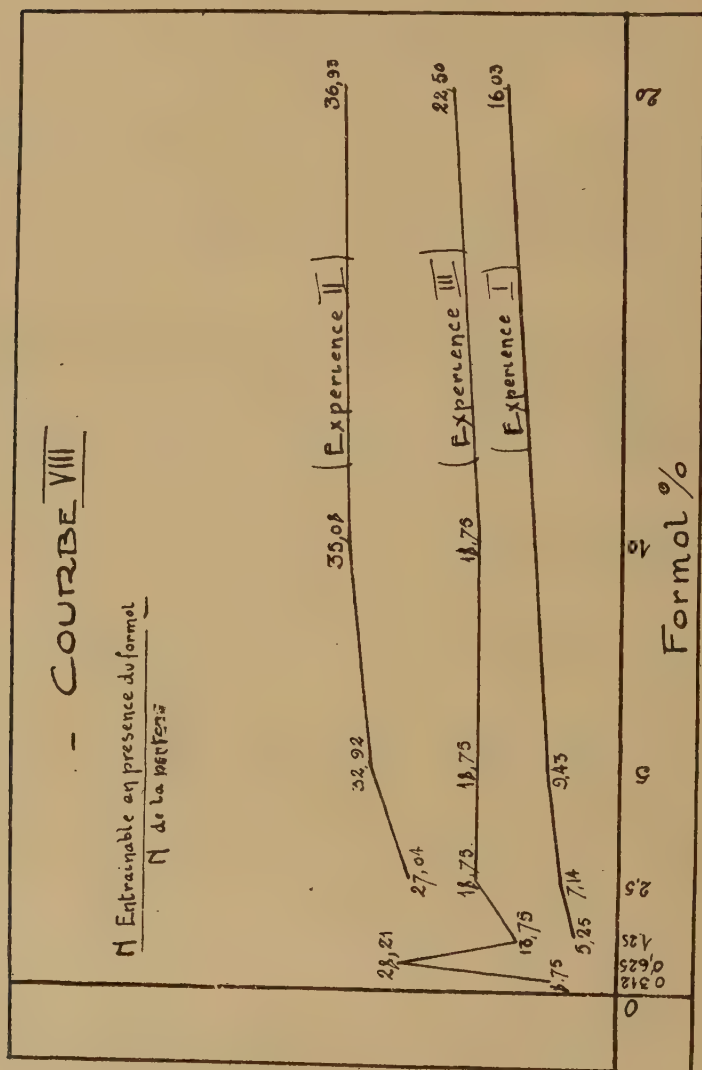
Azote total 3 g. 532 par litre
 Azote de la caséine..... 2 g. 885 —
 Azote restant après séparation de la caséine
 (azote de la peptone)..... 0 g. 647 —

Formol p. 100	Azote restant après précipitation par l'acide acétique	Azote de la peptone entraînable en présence du formol	Rapport p. 100 de l'azote entraînable en présence du formol à l'azote de la peptone
0	0.647		
2.5	0.472	$0.647 - 0.472 = 0.175$	$\frac{0.175 \times 100}{0.647} = 27.04$
5	0.434	$0.647 - 0.434 = 0.213$	$\frac{0.213 \times 100}{0.647} = 32.92$
10	0.420	$0.647 - 0.420 = 0.227$	$\frac{0.227 \times 100}{0.647} = 35.08$
20	0.408	$0.647 - 0.408 = 0.239$	$\frac{0.239 \times 100}{0.647} = 36.93$

EXPÉRIENCE III

Azote total 3 g. 990 par litre
 Azote de la caséine..... 3 g. 430 —
 Azote restant après séparation de la caséine
 (azote de la peptone)..... 0 g. 560 —

FORMOL p. 100	Azote restant après précipita- tion par l'acide acétique	Azote de la peptone entraînable en présence du formol	Rapport p. 100 de l'azote entraînable en présence du formol à l'azote de la peptone
0	0.560		
0.312	0.511	$0.560 - 0.511 = 0.049$	$\frac{0.049 \times 100}{0.560} = 8.75$
0.625	0.402	$0.560 - 0.402 = 0.158$	$\frac{0.158 \times 100}{0.560} = 28.21$
1.25	0.483	$0.560 - 0.483 = 0.077$	$\frac{0.077 \times 100}{0.560} = 13.75$
2.50	0.455	$0.560 - 0.455 = 0.105$	$\frac{0.105 \times 100}{0.560} = 18.75$
5	0.455	$0.560 - 0.455 = 0.105$	$\frac{0.105 \times 100}{0.560} = 18.75$
10	0.455	$0.560 - 0.455 = 0.105$	$\frac{0.105 \times 100}{0.560} = 18.75$
20	0.434	$0.560 - 0.434 = 0.126$	$\frac{0.126 \times 100}{0.560} = 22.50$



CONCLUSIONS

1° Dans ces trois expériences, nous retrouvons le phénomène déjà décrit bien des fois :

A mesure que s'élève la proportion de formol, l'azote précipitable par les acides va en augmentant. Dans les expériences I et II (ainsi qu'il ressort du graphique) l'importance de l'entraînement est fort variable. Minimale dans l'expérience I, il acquiert une valeur très élevée dans l'expérience II. — 20 p. 100 de formol en I, n'agissent pas plus que 2,50 p. 100 en II.

2° L'expérience III nous montre que de 0.312 p. 100 à 2.50 p. 100 de formol, l'entraînement suit une courbe assez capricieuse. A partir de 2.50 p. 100, il devient constant. Tout au plus augmente-t-il légèrement pour 20 p. 100.

3° L'entraînement des albumines et des peptones par le formol est donc un fait bien établi. S'il est possible de prévoir le sens du phénomène, il n'en est pas de même de son importance (1). Toutefois, c'est sur les albumines vraies (Serine-Globuline) que l'action est la plus marquée.

4° Pour en revenir au lait, cette étude sur les mélanges synthétiques nous apprend que la fraction azotée entraînable en présence du formol est en majeure partie constituée par la lactalbumine et la lactoglobuline. Les albumoses, les peptones, les polypeptides interviennent aussi, mais à un taux évidemment moindre.

(1) L'analyse des phénomènes observés est rendue délicate par les phénomènes d'adsorption qui compliquent les expériences. Aussi avons-nous toujours eu soin de nous placer dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques : même caséine, albumine, peptone, même solvant, même concentration, même âge des solutions, même temps de repos, etc...

CINQUIÈME PARTIE

CHAPITRE I

Lait de Femme

La proportion moyenne des différents éléments du lait de femme est la suivante :

	Femme	Vache
Eau	900-910	900-910 g. par litre
Extrait sec.....	130	130-135 —
Lactose anhydre.....	70	50 —
Lipides	40	40 —
Matières azotées.....	11-12	35-37 —
Matières salines	3-3 g. 50	9-9 g. 50 —

Ce qui frappe dans ce tableau, c'est pour le lait de femme, une teneur en lactose plus élevée que pour le lait de vache et une proportion de protéines et de sels incomparablement plus faibles. Ces différences quantitatives expliquent les propriétés si particulières du lait de femme : la diminution des protéines totales, la variation de leurs proportions relatives, l'abaissement du taux des sels, surtout de la chaux et de l'acide phosphorique rendent compte des raisons pour lesquelles le lait de femme ne coagule pas par la présure.

De plus, il est très difficile d'en séparer la caséine. Celle-ci précipite bien par les acides minéraux et organiques, mais elle est si facilement soluble dans un excès que les méthodes employées pour le lait de vache (méthode de HAMMARSTEN par exemple) deviennent inapplicables. La question de savoir si la caséine du lait de femme est précipitée par les acides, a fait l'objet de nombreuses controverses.

En 1772, BERGIUS [18] prétend qu'on obtient un précipité

par addition d'acide azotique ou chlorhydrique. FERRIS [58], STIPRIAAN, LUISCIUS, BONDT, PARMENTIER et DEYEUX [145], NEUBECK [140] sont de l'avis contraire.

DUMAS [52] écrit : « Le lait de femme offre la particularité de ne pas se coaguler même à l'ébullition, par l'acide acétique. Il faut le faire bouillir mêlé d'alcool et ajouter au liquide bouillant de l'acide sulfurique ».

BECHAMP, DANILEWSKY, RADHENAUSEN [164] vont même jusqu'à nier l'existence de la caséine dans le lait de femme.

Sa dilution est aussi un obstacle auquel on se heurte lorsqu'on cherche à la coaguler. Les protéines sont bien représentées par la caséine, l'albumine et la globuline; mais leurs proportions relatives ne sont plus du tout celles du lait de vache. Tandis que dans ce dernier, la caséine est l'élément azoté prédominant atteignant 90 p. 100 de l'azote protéique, dans le lait de femme, sa proportion s'abaisse au point de représenter seulement 50 p. 100 de cet azote. L'autre moitié est constituée par les albumines proprement dites (albumine+globuline); cette haute teneur du lait de femme en albumines justifie le nom de lait albumineux qu'il a reçu.

Nous pouvons aussi prévoir que l'effet protecteur des albumines sur la caséine sera très différent selon qu'on considère le lait humain ou bovin.

Apparemment, ces observations justifient l'opinion des auteurs qui nient l'unicité de la caséine.

KOBRAK [94] admet que la caséine du lait de femme est identique à celle du lait de vache, à cette différence près, que dans le lait de femme la caséine est unie à une molécule complexe de nature inconnue qui s'oppose à sa précipitation. Cette molécule peut être éliminée par une série de dialyses avec de l'eau chloroformée.

HUGO-MEYER [131] observe que le lait de différentes femmes floccule de façon différente. La température de coagulation de la caséine par l'acide chlorhydrique varie suivant les laits de 25° à 35°. De même, l'aspect de la floculation et le quantum de produit formé varient beaucoup. Mais pour le lait d'une femme déterminée, la façon de flocculer est constante durant la lactation. L'auteur conclut que les caséines des mammifères sont différentes d'une famille à l'autre : il y aurait

une « caséine moyenne » propre à chaque famille. Elle subit de petites variations de composition suivant les individus.

Cette opinion a été confirmée par TRENTDEL [205]. Il a vérifié que le point isoélectrique est toujours identique pour la caséine provenant du lait de la même femme, et qu'au contraire il est fort variable pour les caséines de femmes différentes.

Comparons les compositions élémentaires des deux caséines :

	HAMMARSTEN [77]	WROBLEWSKI [222]
	Caséine du lait de vache	Caséine du lait de femme
C	52.96	52.24
H	7.05	7.32
N	15.65	14.97
P	0.848	0.680
S	0.758	1.12

Les chiffres de carbone, d'hydrogène et d'azote sont très comparables : ceux de phosphore et de soufre le sont moins. Ils confirment les observations de LEHMAN (rapportées par HEMPEL) [81] : la caséine du lait de femme contient plus de soufre que celle du lait de vache et au moins moitié moins de phosphore.

Ce que nous savons du facile entraînement réciproque des précipités de nature colloïdale et de la fragilité du complexe « caséinate de calcium + phosphate de calcium » peut nous rendre sceptique sur la pureté absolue des caséines mises en œuvre et pourrait bien expliquer les écarts de composition observés.

BOSWORTH et A. GIBLIN [24] ont donné de la caséine du lait de femme la composition suivante :

N p. 100.....	15.75
P p. 100.....	0.70
S p. 100.....	0.70

Elle se rapprocherait beaucoup de la caséine du lait de vache dont la composition serait :

N	p. 100	15.80
P	p. 100	0.71
S	p. 100	0.72

Il est intéressant de comparer aussi les proportions des différents acides aminés obtenus dans l'hydrolyse des deux caséines. Rapportons les résultats de ABDERHALDEN et SCHITTENHELM [3] pour le lait de vache et ceux de ABDERHALDEN et L. LANGSTEIN [1] pour le lait de femme :

	<i>Caséine de vache</i> p. 100	<i>Caséine de femme</i> p. 100
Alanine	0.9	1.2
Leucine	10.5	8.8
Acide aspartique.....	1.2	1.1
Acide glutamique.....	10.7	10.95
Phényl-alanine	3.5	2.8
Tyrosine	4.5	4.58
Proline	3.1	2.85

Ces résultats, très comparables, révèlent la grande analogie des deux caséines et nous renseignent très utilement sur la nature et la proportion des matériaux constituant l'édifice protéique.

ABDERHALDEN et ROSSNER [2] dans des recherches spectrophotométriques comparées sur les caséines des diverses espèces, sont amenés à conclure à une concordance assez poussée, et peut-être même complète, dans la structure intime des caséines des différents laits qu'ils ont étudiés : femme, vache et chèvre. (PORCHER).

Méthodes de dosage de la caséine

Les recherches sur la répartition de l'azote dans le lait de femme sont subordonnées à la découverte d'une méthode exacte de dosage de sa caséine :

C'est à MEGGENHOFEN [128] en 1826, que revient l'honneur d'isoler la caséine du lait de femme. Il traite l'extrait sec du lait par l'alcool bouillant, puis le reprend par l'eau pure. Le liquide aqueux contient en même temps qu'une partie du lactose, ce qu'il appelle la caséine soluble ; dans le résidu se trouve la caséine insoluble ».

SIMON [189] améliore cette méthode en faisant bouillir l'extrait non plus avec de l'alcool, mais avec de l'éther. Il observe — sans toutefois pouvoir expliquer cette particularité — que le chauffage a une influence défavorable sur la solubilité de la caséine obtenue.

En 1844, CHEVALIER et HENRY [32] font bouillir du lait additionné d'acide acétique; ils obtiennent un précipité qu'ils considèrent comme de la caséine pure, une fois lavé à l'alcool. D'après BOUCHARDAT et QUEVENNE [26], dans ces conditions, il est souvent difficile d'observer même au microscope un coagulum.

TOLMATSCHEFF [204] en 1867, démontre avec certitude que le sulfate de magnésium amène une précipitation. MAKRI [117], en 1876, utilise cette méthode pour obtenir la caséine :

Saturer le lait par SO⁴Mg. Traiter le précipité par l'alcool au bain-marie. Filtrer chaud. Laver à l'eau chaude. Le produit ainsi obtenu est une poudre grise laissant 2 p. 100 de cendres à la calcination, et contenant des traces de sulfate de magnésium. Il l'analyse et compare les résultats avec ceux obtenus sur de la caséine de vache préparée d'une manière différente.

	<i>Femme</i>	<i>Vache</i>
C	52.35 p. 100	53.62 p. 100
H	7.26 —	7.42 —
N	14.65 —	14.20 —

En 1882, PFEIFFER [150] définit les conditions de précipitation de la caséine : quantité d'acide nécessaire, température optimum (40° à 50°).

En 1883, HOPPE-SEYLER donne la méthode suivante :

« Saturer le lait avec du sulfate de magnésium, recueillir le précipité, le laver avec une solution saturée de sulfate de magnésium. Le dissoudre dans l'eau, puis reprécipiter par $\text{SO}^{\cdot}\text{Mg}$. Le laver à l'alcool, puis à l'éther. Le sécher à 40° . Pour le dégraisser complètement, le pulvériser, puis le traiter par l'éther. Le sulfate de magnésium restant est éliminé par dialyse. Sécher. »

J. SCHMIDT a appliqué au lait de femme en la modifiant légèrement la méthode indiquée par HOPPE-SEYLER pour précipiter la caséine du lait de vache :

Après avoir ajouté au lait dilué de l'acide acétique à 0.4 p. 100 jusqu'à précipité, faire passer pendant 30 minutes et à 40° un courant de CO^2 . Laisser déposer 20 heures, laver à l'alcool et à l'éther.

PFEIFFER [152] conseille d'opérer à une température de $62^{\circ}5$ à $67^{\circ}5$, et remplace l'acide acétique par l'acide chlorhydrique. L'objection évidente, c'est qu'on s'approche trop de la température de coagulation des albumines proprement dites et qu'on risque ainsi d'en entraîner en même temps que la caséine.

Le procédé de HAMMARSTEN de précipitation à l'aide d'acide acétique dilué ne se laisse appliquer qu'au lait de vache à cause de l'extrême solubilité de la caséine dans un excès d'acide.

LEHMANN [81], appliquant au lait de femme son procédé par simple filtration sur porcelaine poreuse, trouve environ 12 g. de caséine par litre. SCHLOSSMANN [181] modifie cette méthode et filtre le lait sous pression. D'après ses résultats, la caséine représente 41 p. 100 de l'azote total. Sa méthode à l'alun concentré, pour la précipitation de la caséine du lait de vache, peut s'appliquer au lait de femme; mais il faut ajouter au lait avant sa coagulation, quelques cristaux de chlorure de sodium et avant la filtration, du phosphate de potassium.

Cette méthode a fourni les résultats suivants pour le rapport : $\frac{\text{N caséine}}{\text{N total}}$

CAMERER et SOLDNER [31].	39.6 — 69.39	p. 100
ZAITSHECK [225].....	34.6 — 40	p. 100

BIENENFELD [20] propose la technique suivante :

Centrifuger le lait frais dans une centrifugeuse rapide (3.000 tours-minute). Ecrémer mécaniquement. Décantier doucement le lait maigre. Doser alors l'acidité à la phénol-phtaléine. Diluer la prise d'essai de 4 fois son volume d'eau. Ajouter suffisamment d'acide lactique N/10 pour amener le milieu à une acidité de 2 cm³ 5 à 3 cm³ de NaOH N/10. Porter au bain-marie à 40°; la caséine se rassemble en flocons à la surface. Prendre soin de bien agiter pendant la coagulation. La précipitation est réglée par le degré acidimétrique total du lait (entre 2 cm³ 5 et 3 cm³ de soude N/10) et à cette seule condition, elle est quantitative. De là, la nécessité de doser l'acidité du lait pour savoir la quantité d'acide lactique à verser.

FULD et WOHLGEMUTH [67] observent que l'addition d'acide acétique à du lait refroidi à 2° ou 3° depuis trois jours, entraîne une coagulation. La congélation agit sur les colloïdes en amenant leur floculation, par grossissement des micelles. Cette floculation est irréversible, contrairement à ce que l'on observe dans le gel des colloïdes d'origine animale ou végétale. Il n'y a pourtant pas lieu de s'étonner, la caséine par la grosseur de ses micelles se rapprochant des colloïdes inorganiques.

FULD rapporte ses expériences :

A 2 cm³ de lait refroidi, ajouter 2 cm³ d'eau distillée, puis une goutte d'acide acétique à 5 p. 100. Pour 7 prises d'essai suffisamment refroidies (3 jours à la glacière), la floculation a été très nette; au contraire, elle n'a pu être observée sur une huitième maintenue au froid moins longtemps. L'auteur fait aussi remarquer qu'il vaut mieux opérer sur de petites prises d'essai, et qu'il est indifférent d'utiliser du lait pur ou dilué.

ENGEL [57] a précisé les conditions de précipitation de la caséine :

Dans la prise d'essai diluée au 1/5°, verser de l'acide acétique, jusqu'à une acidité de 60 à 80 cm³ d'acide N/10 pour 100 cm³ de lait primitif. Refroidir le mélange à 3° ou 4° pendant 3 heures au moins. Un séjour plus long dans la glacière ne gêne pas. Lorsqu'une fine floculation apparaît, agiter, puis porter au bain-marie à 40° pendant quelques minutes. Filtrer ensuite. La filtration est rapide. Les premiers centimètres cubes qui s'écoulent sont repassés jusqu'à obtention d'un filtrat limpide.

FREHN [65] a constaté que la plupart des laits filtrent bien, alors que certains conservent une légère opalescence due probablement à un reste de caséine non précipitée. Cette opalescence ne peut être attribuée à la matière grasse, car elle a été indifféremment observée sur des laits pauvres ou riches en beurre. C'est l'excès ou le manque d'acide qui la produit : ainsi, du lait donne un filtrat clair par addition de la quantité théorique d'acide et un filtrat opalescent, si cette quantité est double. En tous cas, ce ne sont jamais que des traces négligeables de caséine qui échappent à la précipitation. FREHN a vérifié que les résultats obtenus par ces deux procédés sont tout à fait comparables. Le tableau suivant en fait preuve.

	N TOTAL	N restant dans le filtrat après traitement par la méthode de :		N de la caséine en centièmes de l'azote total		Acidité du lait NaOH N/10 pour 10 cm ³
		Engel	Bienenfeld	Engel	Bienenfeld	
Lait centrifugé	0.193	0.100	0.098	48.2	49.2	0.5
Lait centrifugé	0.136	0.077	0.078	43.4	42.6	0.35
Lait non centrifugé	0.118	0.078	0.078	33.3	33.3	0.8

Il est curieux de remarquer que FREHN obtient par la méthode de BIENENFELD des résultats beaucoup plus élevés que BIENENFELD elle-même. Pour le rapport $\frac{\text{N caséine}}{\text{N total}}$ il trouve

de 30 à 53.6 p. 100, en moyenne 42.93 p. 100 (expériences sur 27 laits), et elle trouvait seulement de 16 à 20 p. 100. Dans deux cas, où elle avait opéré sur du lait assez âgé et fort acide, elle avait obtenu 52.6 p. 100.

DEMUTH [41], en 1924, a obtenu à partir du lait de femme un petit lait parfaitement privé de caséine en utilisant des mélanges tampons. Les conditions optima pour obtenir un filtrat clair sont les suivantes :

Lait	17 cm ³
Acide acétique N.....	2 cm ³ 4
Acétate de soude N.....	0 cm ³ 6

Porter au bain-marie à 40°. La floculation commence après dix minutes et elle est terminée en 3 heures (pH du filtrat = 4.16).

Cette méthode est simple et ne nécessite ni centrifugation du lait, ni traitement préalable par le froid.

CHAPITRE II

Influence du formol sur la précipitation des protéines du lait de femme

Pour déterminer l'azote non protéique, nous avons choisi l'acide phosphotungstique comme désalbuminant.

Dans 5 cm³ de lait, verser 1 cm³ d'acide sulfurique au 1/4, puis 4 cm³ de réactif phosphotungstique (1). Laisser au repos quelques heures. Filtrer. Doser l'azote dans le filtrat. Rappor-ter au litre.

D'après RIETSCHEL, puis CAMERER et SOLDNER [30], l'azote résiduel oscille entre 12 et 20 p. 100 de l'azote total. FREHN [65], par contre, n'en a jamais trouvé moins de 16 p. 100. Ses résultats sont plutôt voisins de 20 p. 100. Il pré-cipite par l'acide phosphotungstique le sérum provenant de la séparation de la caséine et dose l'azote dans le filtrat.

Pour lui, les chiffres faibles de CAMERER et SOLDNER sont dus à l'entraînement d'une fraction de l'azote résiduel par le précipité albuminoïdique, entraînement dû au fait que ces auteurs ont désalbuminé le lait directement et n'ont pas, comme lui, opéré par précipitation fractionnée (caséine d'abord, albumines ensuite).

Cette explication n'est pas valable : dans nos essais, nous avons toujours opéré par désalbumination directe du lait et jamais nous n'avons obtenu de pourcentages d'azote résiduel de l'ordre de ceux de CAMERER et SOLDNER. Nos résultats sont tout à fait comparables à ceux de FREHN. Il est même inté-ressant de remarquer la constance du rapport : $\frac{N \text{ résiduel}}{N \text{ total}}$
Il oscille entre 16 et 20 p. 100 et sa valeur moyenne est 17 ou 18.

L'azote total est dosé sur le produit de la destruction sul-furique de 1 cm³ de lait frais et bien homogénéisé, par agita-

(1) Préparation du réactif voir note (1) page 82.

tion. La caséine est séparée par la méthode de DEMUTH. L'azote résiduel ou azote non protéique est obtenu en désalbuminant le lait par l'acide phosphotungstique comme nous le disons plus haut.

L'azote des albumines solubles (albumine+globuline) est fourni par la différence : azote restant dans le filtrat après séparation de la caséine — azote résiduel.

EXPÉRIENCE I

« Formule azotée »

<i>N</i> total.....	2 g. 579 par litre
<i>N</i> de la caséine.....	1 g. 107 —
<i>N</i> albuminoïdique.....	1 g. 021 —
<i>N</i> résiduel	0 g. 451 —

en centièmes de l'azote total

<i>N</i> de la caséine.....	42.92 p. 100
<i>N</i> albuminoïdique.....	39.58 p. 100
<i>N</i> résiduel	17.48 p. 100

A des prises de lait identiques, nous avons ajouté en proportion croissante (2.5 — 5 — 10 et 20 p. 100) de la solution commerciale de formaldéhyde neutralisée et titrée.

La méthode de DEMUTH a été appliquée à chaque lait formolé après avoir établi dans chacun des cas le mélange tampon convenable donnant une précipitation complète, c'est-à-dire un filtrat limpide.

Dans les différents filtrats, l'azote a été dosé et, comme on pouvait s'y attendre par analogie avec le lait de vache, la proportion d'azote restant diminue à mesure qu'augmente la quantité de formol.

FORMOL p. 100	Azote restant en grammes par litre après précipitation par la méthode de Demuth
0	1 g. 472
2.5	1 g. 330
5	1 g. 148
10	1 g. 004
20	0 g. 726

INFLUENCE DU FORMOL

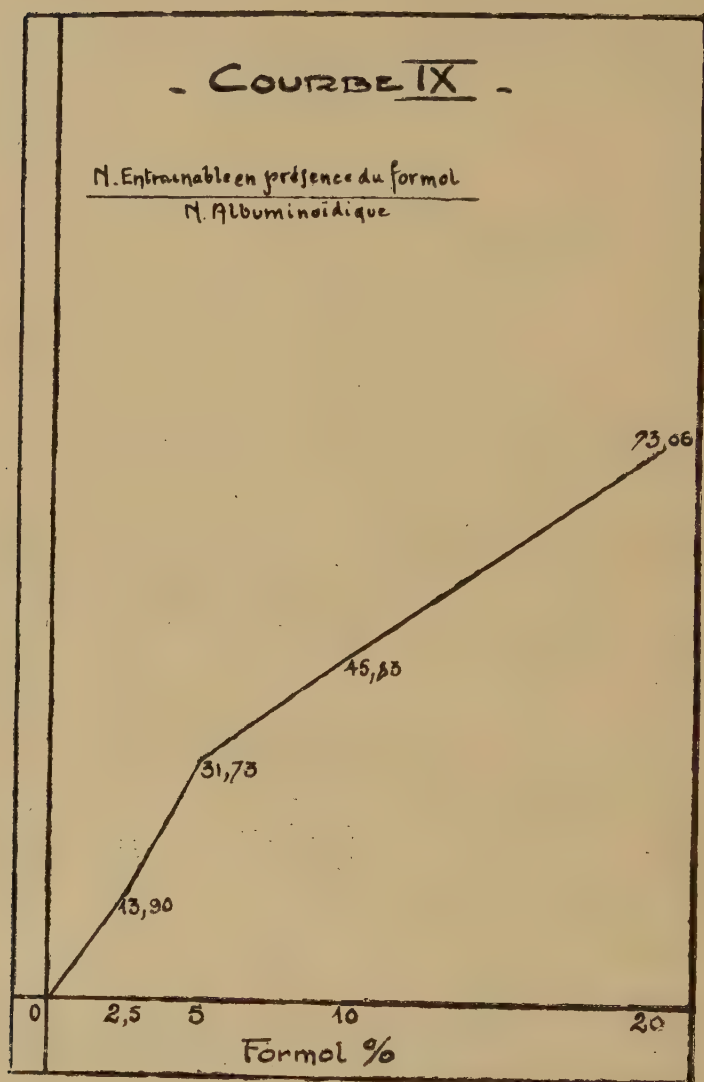
La fraction albuminoïdique entraînable en présence du formol est ici beaucoup plus importante que dans le cas du lait de vache, vu la haute teneur du lait de femme en albumines. Cette fraction croît avec la proportion de formol :

FORMOL p. 100	AZOTE PROTÉIQUE	Surcharge azotée en présence de formol
	N total — N restant après précipitation par l'acide acétique (Méthode de Demuth)	
0	2.579—1.472=1.107	0
2.5	2.579—1.330=1.249	0 g. 142
5	2.579—1.148=1.431	0 g. 324
10	2.579—1.004=1.575	0 g. 468
20	2.579—0.726=1.853	0 g. 746

Cette fraction rapportée aux albumines totales du lait révèle encore mieux le phénomène :

FORMOL p. 100	RAPPORT p. 100 de l'azote entraînable en présence du formol à l'azote albuminoïdique total
2.5	$\frac{100 \times 0.142}{1.021} = 13.90$
5	$\frac{100 \times 0.324}{1.021} = 31.73$
10	$\frac{100 \times 0.468}{1.021} = 45.83$
20	$\frac{100 \times 0.746}{1.021} = 73.06$

Portons sur un graphique en abscisses, les pourcentages de formaldéhyde et, en ordonnées, les différentes valeurs de ce rapport, nous obtenons la courbe IX :



EXPÉRIENCE II

« Formule azotée »

N total.....	2 g. 440 par litre
N de la caséine.....	1 g. 383 —
N albuminoïdique.....	0 g. 630 —
N résiduel	0 g. 427 —

en centièmes de l'azote total

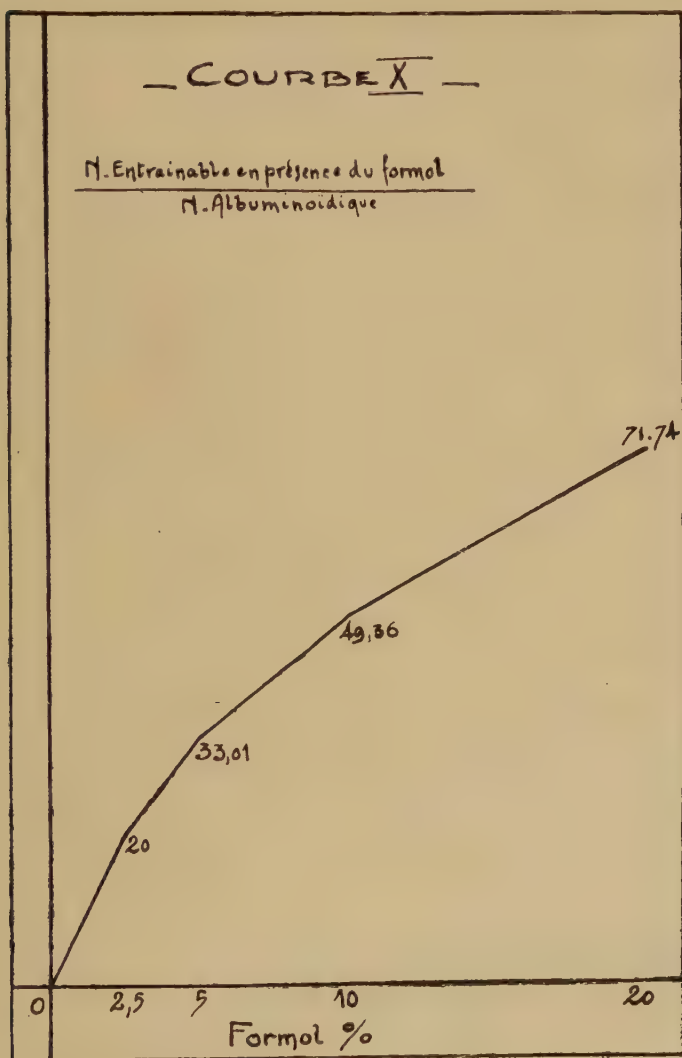
N de la caséine.....	56.68 p.100
N albuminoïdique.....	25.81 p. 100
N résiduel	17.50 p. 100

FORMOL p. 100	Azote restant en grammes par litre après précipitation par la méthode de Demuth
0	1.057
2.5	0.931
5	0.849
10	0.746
20	0.605

FORMOL p. 100	AZOTE PROTÉIQUE	Surcharge azotée en présence de formol
	N total — N restant après précipitation par l'acide acétique (Méthode de Demuth)	
0	2.440—1.057=1.383	0
2.5	2.440—0.931=1.509	0.126
5	2.440—0.849=1.591	0.208
10	2.440—0.746=1.694	0.311
20	2.440—0.605=1.835	0.452

INFLUENCE DU FORMOL

FORMOL p. 100	RAPPORT p. 100 de l'azote entraînable en présence du formol à l'azote albuminoïdique total
2.5	$\frac{0.126 \times 100}{0.630} = 20$
5	$\frac{0.208 \times 100}{0.630} = 33.01$
10	$\frac{0.311 \times 100}{0.630} = 49.36$
20	$\frac{0.452 \times 100}{0.630} = 71.74$



En conclusion, les phénomènes observés sur le lait de femme sont en tous points comparables à ceux observés sur le lait de vache.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les constituants normaux azotés que l'on rencontre dans le lait sont les suivants : caséine, albumine, globuline, albumoses et peptones, polypeptides, acides aminés, urée, composés du groupe de la purine et de la guanidine. Dans notre travail, nous avons d'abord passé en revue les différentes méthodes qui ont été proposées pour la détermination quantitative des fractions :

Azote total, Caséine, Lactalbumine, Azote résiduel.

Après avoir établi les méthodes qui nous permettent d'obtenir la « Formule azotée » d'un lait, c'est-à-dire :

Azote total

Azote caséinique

Azote albuminoïdique

Azote non protéique

nous avons étudié quelle influence exerce le formol sur la précipitation quantitative de ces diverses fractions par les réactifs suivants : acides acétique, trichloracétique, lactique, citrique. Nos expériences ont porté, d'une part sur le lait de vache, d'autre part sur le lait de femme; pour ce dernier, les phénomènes sont particulièrement nets, vu la forte proportion d'albumines qu'il contient.

I. — L'addition au lait de formol neutralisé provoque une sorte de « stabilisation » des constituants protidiques, l'expérience montrant qu'en présence du formol, il faut ajouter à une même quantité de lait, une dose d'acide plus élevée qu'en l'absence de formol, pour obtenir un filtrat ne précipitant plus par addition ultérieure de même acide. Ce fait est assez curieux et inattendu puisque le formol insolubilise les protides, en général.

II. — A mesure que s'élève la proportion de formol, la quantité d'azote protéique précipitable par les acides va en augmentant. Le chiffre d'azote restant tend à rejoindre celui que donne la précipitation phosphotungstique, prise comme terme de comparaison. Cependant, quelle que soit la quantité de formol ajoutée dans nos expériences, nous n'avons pu, en aucun cas, avoir une précipitation aussi complète que par l'acide phosphotungstique. L'influence du formol s'est fait déjà nettement sentir à des doses de 1.25 p. 100 et même au-dessous (cas des mélanges synthétiques dont nous parlerons plus loin). Elle s'exprime par le rapport :

$$\frac{\text{Azote entraînable en présence du formol}}{\text{Azote albuminoïdique}}$$

III. — La marche du phénomène est indépendante de la nature de l'acide utilisé. Celle-ci n'intervient que pour déterminer le point de départ et la pente de la courbe. Il est donc possible de prévoir la marche du phénomène.

IV. — Si le sens du phénomène peut être prévu, il n'en est pas de même de sa grandeur. Il semblerait qu'à partir d'une certaine teneur en formol, l'augmentation de celle-ci ne puisse provoquer une nouvelle diminution de l'azote restant : l'expérience prouve qu'il n'en est rien.

V. — A première vue, on doit admettre que l'azote précipité en surplus de l'azote caséinique est formé par la fraction albuminoïdique vraie (lactalbumine+lactoglobuline) et peut-être par les polypeptides. Pour appuyer cette hypothèse, nous avons réalisé des mélanges synthétiques « Caséine+Albumines » et « Caséine+Peptone » et l'expérience nous a montré qu'il y avait bien entraînement partiel des albumines dans un cas et des constituants de la peptone dans l'autre. (A cette occasion, nous avons vérifié le pouvoir rotatoire, la teneur en azote et en phosphore de la caséine et comparé les résultats à ceux qui sont couramment admis et que nos recherches ont confirmés.)

Toutes ces expériences témoignent nettement d'une transformation des matières albuminoïdes sous l'influence du formol. Cette transformation peut s'expliquer soit par la formation de combinaisons du type « méthylène-protéine » de SCHIFF :



ou du type « formol-protéine » de REINER et MARTON :



Dans l'un et l'autre cas, on doit admettre une modification de la nature des protéines, donc une modification de leurs réactions de précipitation. Cette modification est mise en évidence par le seul fait que nous avons signalé de la « stabilisation » des protides du lait, vis-à-vis des acides.

Mais ce n'est certainement pas le seul facteur qui intervient. S'il était seul à intervenir, en effet, dès qu'on aurait ajouté au lait une quantité suffisante d'aldéhyde formique pour provoquer la transformation complète des matières protéiques dans le sens indiqué, l'addition d'une nouvelle quantité de formol ne devrait pas se traduire par une diminution nouvelle de l'azote restant dans le filtrat. La courbe atteindrait un palier que nous n'avons jamais pu rencontrer, même pour une proportion de formol de 50 p. 100. On est donc obligé d'admettre qu'il intervient également des phénomènes d'adsorption. Ils compliquent les expériences et en rendent l'interprétation délicate.

On a bien aussi constaté que l'addition du formol au lait se traduit par une augmentation de l'acidité qui, elle, n'augmente plus à partir d'une dose de formol convenable : 5 p. 100 (**indice d'aldéhyde**). On pourrait être tenté d'expliquer au moins partiellement par cette augmentation d'acidité les phénomènes observés. Cette hypothèse n'est pas vraisemblable. Elle pourrait être admise dans le cas d'une précipitation des protides par un réactif neutre tel que SO^4Mg ou SO^4Na^2 . Elle

ne peut être retenue pour nos expériences où le réactif précipitant est précisément un acide et où la dose d'acide ajouté est considérablement supérieure à l'acide libéré par la seule addition de formol.

Nous pensons avoir apporté ainsi une contribution intéressante à l'étude de cette question si complexe qu'est la séparation quantitative des divers protides qu'on peut rencontrer dans un même liquide biologique. Nous nous proposons d'ailleurs de poursuivre ces recherches.

Vu, bon à imprimer :
Le Président de la Thèse,
GRIMBERT

Vu :
Le Doyen de la Faculté,
RADAIS

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY

BIBLIOGRAPHIE

Les abréviations des références suivantes sont celles du
Bulletin de la Société de Chimie Biologique.

BIBLIOGRAPHIE

1. E. ABDERHALDEN et L. LANGSTEIN. — Vergleichende Untersuchung über die Zusammensetzung des caseins aus Frauen-und Kuhmilch. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1910, **66**, 8-12.
2. E. ABDERHALDEN et E. ROSSNER. — Vergleichende spektrophotometrische Untersuchung von Casein aus verschiedenen milcharten. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1927, **168**, 171.
3. E. ABDERHALDEN et A. SCHITTENHELM. — Vergleichung der Zusammensetzung des caseins aus Frauen-Kuh-und Ziegenmilch. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1906, **47**, 458-465.
4. F. ALEXANDER. — Zur Kenntniss des Caseins und seiner peptischen spaltungsprodukte. *Ztschr. für physiol. Chem.* 1898, **25**, 411-429.
5. J. ALEXANDER et J.-G.-M. BULLOWA. — « Protective » action of the colloïds in milk. *Chemical News*, 1910, **101**, 193-195.
6. ALMEN. — Upsala laekare forenings foerhandlingar, 1870.
7. H.-V. ARNY et H.-H. SCHAEFER. — *Journ. of soc. of Chem. Industry*, 1904, 979.
8. M. ARTHUS. — Recherches sur quelques substances albuminoides. La classe des caséines. La famille des fibrines. *Th. Doct. ès-sc.* Paris, 1893.
9. E. BARRAL. — *Bull. Soc. Chim. France*. Section de Lyon, 1908, 4^e série, **3**, 186.
10. BAUDOIN et LEWIN. — Une nouvelle méthode de dosage de petites quantités de sucre. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 480.
11. J. BAUER et ST. ENGEL. — Über die chemische und biologische differenzierung der drei Eiweiss Koerper in der Kuh-und Frauenmilch. *Biochem. Ztschr.*, 1931, **31**, 46-64.

12. M. BEAU. — Les matières albuminoïdes du lait. *Le Lait*, 1921, **1**, 19.
13. M. BEAU et CH. BOURGAIN. — L'industrie fromagère. I. La Science fromagère. Ed. Baillière, 1926.
14. A. BÉCHAMP. — Recherches sur l'isomérisation dans les matières albuminoïdes. *C. R. Ac. Sc.*, 1873, **77**, 1525.
15. A. BÉCHAMP. — Mémoire sur les matières albuminoïdes. *Académie des sciences de l'Institut de France*. Extrait du tome 28. Imprimerie nationale, Paris, 1884.
16. A. BÉCHAMP. — Sur la caséine et le phosphore organique de la caséine. *Bull. Soc. chim.*, 1894 (3), **11**, 152-176.
17. BERG. — Das molkeneiweiss (Ziger), seine Darstellung, sein Wesen, sein naehrwert und seine Verwendung in der Kaserei. Arbeiten des deutschen Milchwirtschaftlichen Reichsverbandes, 1921, **48**.
18. BERGIUS. — Schwed. Academ. Abhandlung, **34**.
19. BIEDERT. — Die Kinderrernährung im Säuglingsalter, cité par Schlossmann [181], 204.
20. BIENENFELD. — Das Verhalten der Frauenmilch zu lab und saure. *Biochem. Ztschr.*, 1907, **7**, 262-281.
21. BIFFL. — *Virchow's Arch.*, 1898, **152** 130.
22. A. BLANCHETIÈRE. — L'évolution de nos connaissances sur la structure chimique des matières protéiques. *Bull. Soc. chim. Biol.*, 1925, **7**, 218-330.
23. A. BONJARD et E. BAIER. — Manuel du chimiste alimentaire. 2^e éd., 1900, 118.
24. A. W. BOSWORTH et L. A. GIBLIN. — The casein of human milk. *Journ. of. biol. Chem.*, 1918, **35**, 115-117.
25. A. W. BOSWORTH et L. L. VAN SLYKE. — Préparation and composition of basic calcium caseinate and paracaseinate. *Journ. of. Biol. Chem.*, 1913, **14**, 207-209.
26. BOUCHARDAT et QUÉVENNE. — *Du lait*. Paris, 1857.
27. BRACONNOT. — *Ann. de phys. et chim.*, 1830, **33**, 43.
28. L. J. BRIGGS et M. H. LAPHAM. — U. S. Department of Agriculture. Bureau of Soils, 1902, Bull. 19, 31 ; O. SCHREINER et G. H. FAIRYER, *idem*, 1906, Bull. 31, 12-16.

29. H. W. BUSTON et S. B. SCHRYVER. — A method for the separation of amino-acids from the products of Hydrolysis of Proteins and other sources. *Biochem Journ.*, 1921, **15**, 636-642.
30. CAMERER et SOLDNER. — *Ztschr. für Biol.* **15**, 535.
31. CAMERER et SOLDNER. — *Ztschr. für Biol.* **18**, 277.
32. CHEVALIER et HENRY. — Cité par Makris [117].
33. E. J. COHN et J. L. HENDRY. — *The Journ. of gen. physiol.*, 1922, **4**, 697 et *The Journ. of gen. physiol.*, 1923, **5**, 551-553.
34. COMMAILLE. — *Jahresbericht der Chemie*, 1868, 828.
35. H. COPAUX. — Procédé rapide pour doser l'acide phosphorique. *C. R. Ac. Sc.*, 1921-22, **1**, **173**, 656. Voir aussi *Daric Bull. Soc. Chim.* [4], 1924, **35**, 409.
36. P. CRISTOL. — Etude sur la désalbumination du sang et des humeurs en vue du dosage de l'azote total non protéique. Paris, Maloine.
37. CROWTHER et RAISTRICK. — A comparative study of the proteins of the colostrum and milk of the cow and their relations to serum proteins. *Biochem. Journ.*, 1916, **10**, 434.
38. T. CURTIUS. — *Journ. für Prakt. chem.*, 1881 [2], **24**, 239-240; *Ber. d. deut. chem. ges.*, 1883, **16**, 753-757; *Ber. d. deut. chem. ges.*, 1890, **23**, 3023-3033.
39. H. D. DAKIN. — Amino-Acids of Gelatin. *Journ. of biol. chem.*, 1920, **44**, 499-529.
40. A. DANILEWSKY et RADENHAUSEN. — Untersuch. über die Eiweissstoffe der milch (*Petersen's Forschungen*, 1880).
41. F. DEMUTH. — Ueber die Flockung des Frauenmilcheaseins. *Biochem. Ztschr.*, 1924, **150**, 144-148.
42. G. DENIGÉS. — Application de l'acide métaphosphorique à la séparation des albuminoïdes du lait pour le dosage de la lactose. *Bull. Soc. Chim.*, 1892, **1**, **7**, 493-499, ou *Bull. Soc. Pharm.* Bordeaux, 1893, **33**, 48-51 et 70-75.
43. G. DENIGÉS. — *Précis de Chimie analytique*. 5^e éd. Maloine, Paris, 1920.
44. W. DENIS et A.-S. MINOT. — Methods for the quantitative determination of the non protein nitrogenous constituents of milk. *Journ. of biol. chem.*, 1919, **37**, 353-366.

45. W. DENIS et A.-S. MINOT. — The non protein nitrogenous constituents of cow's milk. *Journ. of biol. chem.*, 1919, **38**, 453-458.
46. DEYEUX et PARMENTIER. — *Ann. de Chimie*, 1790, **7**, 183.
47. M. DIETRICH. — Ueber phosphorhaltige Caseinpeptone. *Biochem. Ztschr.* 1909, **22**, 120-130.
48. DRECHSEL. — *Hermann's Handbuch der Physiologische Chemie*, **1**, 551.
49. E. DUCLAUX. — Mémoire sur le lait. *Ann. Inst. nat. Agronomique*, 1879-1880, n° 5.
50. E. DUCLAUX. — Le lait. Etudes chimiques et microbiologiques. Edit. Bailliére, Paris, 1887.
51. DUMAS. — Rapporté par Béchamp [14], 1529.
52. DUMAS. — *Traité de chimie appliquée aux arts*, **8**, 628.
53. DUMAS et CAHOURS. — Mémoire sur les matières azotées neutres de l'organisation. *Ann. de phys. et chimie*, 1842, **6**, 385.
54. DURUPT. — Microméthodes et semi-microméthodes. Poinat, édit., Paris, 1924.
55. EICHWALD. — *Bull. Soc. Chim.*, 1873, **20**, 414.
56. EMMERLING. — Article « Milch » dans le dictionnaire de Ladenburg.
57. ENGEL. — Eine einfache methode der quantitativen abscheidung des caseins aus genuiner Frauenmilch. *Biochem. Ztschr.* 1908, **14**, 234-237.
58. S. FERRIS. — Ueber die Milch — Deutsche Uebersetzung, 1787.
59. FISCHER. — *Ber.*, 1903, **36**, 2982.
60. FISCHER. — Conférence à la Soc. Chim. allemande, 6 janvier 1906 (*Ber.*, **39**, 530). Untersuchungen über amino säuren, polypeptide und protéine. I, 1899-1906, II, 1907-1919; Springer, Berlin.
61. P. FLEURY et H. LEVALTIER. — Recherches sur le dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl et ses modifications. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1924 [7], **29**, 137-147.
62. P. FLEURY et Z. SUTU. — Essai des glycérophosphates par la méthode de Copaux. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1927, [8], **5**, 56-62.

63. FONTÈS et THIVOLLE. — Méthode de microdosage manganométrique du glucose. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1921, **3**, 226.
64. FOREMAN. — *Biochem. Journ.*, 1919, **13**, 378.
65. A. FREHN. — Die Stickstoffverteilung in der Frauenmilch. *Ztschr. für physiol. chem.*, 1910, **65**, 256-280.
66. J. FRENZEL et TH. WEYL. — Ueber die Bestimmung des Kuh-caseins durch Faellung mit Schwefelsäure. *Ztschr. für physiol. chem.* 1885, **9**, 246-252.
67. E. FULD et J. WOHLGEMUTH. — Ueber eine neue methode zur ausfaellung des reinen caseins aus der Frauenmilch durch saure und lab sowie über die natur der labhemmenden Wirkung der Frauenmilch. *Biochem. Ztschr.*, 1907, **5**, 118-141.
68. GEOFFROY. — Histoire de l'Académie royale des Sciences de Paris, 1732.
69. CH. GERHARDT. — *Traité de chimie organique*, 1856, **4**, 432.
70. GIRGENSOHN. — Beiträge zur Albuminometrie u. z. Kenntniss der Tanninverbindungen der Albuminate. Dorpat. 1872.
71. W. C. GRIGG. — Metaphosphoric acid a delicate test for albumen in urines. *Brit. Médical Journ.* 1880, 809.
72. W. GRIMMER, C. KURTENACKER et R. BERG. — Zur Kenntnis der serumeiweisskörper des milch. *Biochem. Ztschr.* 1923, **137**, 465-483.
73. J. GUIART et L. GRIMBERT. — *Précis de Diagnostic*, 4^e éd., Paris, 1922.
74. J. W. GUNNING. — Ueber eine modification der Kjeldahl-methode. *Ztschr. für anal. chem.*, 1889, **28**, 188-191.
75. O. HAMMARSTEN. — *Milchzeitung*, 1875.
76. O. HAMMARSTEN. — *Centralb. für die méd. Wissenschaft*, 1878, 470.
77. O. HAMMARSTEN. — Zur Frage ob das Casein ein einheitlichen Stoff. sei. *Ztschr. für physiol. Chem.* 1882-83, **7**, 227-273.
78. O. HAMMARSTEN. — Zur Kenntniss der Nucléoprotéide. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1894, **19**, 19-37.

79. W.-B. HARDY. — A preliminary Investigation of the conditions which determine the stability of irreversible Hydrosols. *Proc. of the Roy. Soc. of London*, 1899-1900, **66**, 110.
80. E. B. HART. — A volumetric méthode for the estimation of casein in cow's milk. *Journ. of biol. Chem.*, 1909, **6**, 445-451.
81. W. HEMPEL. — Die milchuntersuchungen Prof. Lehmanns *Pflügers Archiv*, **56**.
82. L. HERMANN. — *Pflügers Archiv*, 1881, **26**, 442.
83. C. HINDENLANG. — Die métaphosphorsaure und ihre Verwerthbarkeit als Eiweissreagens des Harns. — Berlin. *Klin. Wochens.* 1881, **18**, 205-207.
84. HOPPE-SEYLER. — *Virchow's Arch.*, 1859, **17**.
85. HOPPE-SEYLER. — *Chemisches Centralblatt*, 1865, 785.
86. HOPPE-SEYLER. — *Med. Chem. Untersuchungen*, 1867, **2**.
87. HOPPE-SEYLER. — *Handbuch der physiol. und patholog. Analyse*. Berlin, 1883.
88. HOPPE-SEYLER. — *Handbuch der physiol. Chem. Analyse*, 1893, 5^e éd., 462.
89. L. HUGOUNENG. — Recherches sur le passage des solutions de caséine à travers la porcelaine. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1892 (5), **26**, 109-113 et 155-157.
90. A. D. IONESCU-MATTU et C. V. BORDEIANO. — Nouvelle méthode de dosage volumétrique des substances protéiques du lait. *Bull. Soc. Chim. Ind.*, 1927, 44.
91. F. A. KEHRER. — *Archiv. für Gynak*, 1871, **2**, 5, cité par SCHLOSSMANN [181].
92. KJELDAHL. — Sur une nouvelle méthode de dosage de l'azote dans les substances organiques (Meddelelser fra Karlberg Labor, 1883, II, livre I^{er}, p. 1 et suiv. (Part. Franc.). — Neue Méthode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Koerper. *Ztschr. anal. chem.*, 1883, **22**, 366-382.
93. KLIKENBERG. — Ueber die Nucleine. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1882, **6**, 566-571.
94. KOBRAK. — *Pflügers Archiv*, 1900, **80**, 69.
95. KÖENIG. — *Ztschr. für die Untersuchung der Nahrungs und Genussmittel*, 1914, **3**, 1^{re} partie, 187.

96. A. KOSSEL. — Weitere Beitræge zur chemie des Zellkerns. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1886, **10**, 248-264.
97. A. KOSSEL. — (1891) *Virchow's Arch.* Quoted from Raudnitz (1903), *Ergeb. Physiol.* **2**, 193.
98. W. KOSSEL. — *Ann. d. Physik*, 1916, **49**, 229.
99. KREHL et MATTHES. — *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1895, **36**, 439.
100. E. LAMBLING. — Précis de Biochimie. Masson, édit., Paris, 1922, page 36-39.
101. I. LANGMUIR. — *Journ. of Amér. Chem. Soc.*, 1919, **12**, 868.
102. E. LAQUEUR et O. SACKUR. — *Beitr. Chem. Phys. n. Path.*, 1902, **3**, 193-224.
103. LEFORT. — Jahresbericht der Chemie, 1866, 747.
104. LEHMANN. — *Ann. der Chem. und Pharm.*, 1877, 189.
105. G. N. LEWIS. — *Journ. of Amér. Chem. Soc.*, 1916, **38**, 762.
106. LIBORIUS. — Beitræge zur quantitativen Eiweissbestimmung. Dorpat, 1871.
107. LIEBERMANN. — *Liebig's Ann.*, **181**, 90-102.
108. Ph. LIMBOURG. — Ueber Loesung und Faellung von Eiweisskoerpern durch salze. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1889, **13**, 450-463.
109. L. LINET. — Sur les formes que le phosphore et le calcium affectent dans la caséine du lait. *C. R. Ac. Sc.*, 1912, **155**, 923.
110. L. LINET. — Influence de la minéralisation des caséines sur leur solubilité. *C. R. Ac. Sc.*, 1914, **159**, 122.
111. LINET et AMMANN. — Contribution à l'étude des matières albuminoïdes solubles du lait. *Ann. Inst. Nat. Agronomique*, 1906, 2^e série, **5**, 283-296, et 1913, 2^e série, **12**, 273-298.
112. J. LÆB. — Les Protéines. Traduit de l'anglais par H. Mouton. Librairie F. Alcan, 1924.
113. LUBAVIN. — Quoted from Raudnitz (1903), *Ergeb. Physiol.*, **2**, 193.
114. LUDOLF. — Einleitung in der Chemie, Erfürth, 1752, 102.

115. O. LUNING et P. HERZIG. — *Ztschr. für Untersuchung der Nahrungs u. Genussmittel*, 1921, **42**, fasc. 1-2.
116. MACQUER. — Dictionnaire de Chimie, Paris, 1781.
117. MAKRIK. — Studien über die Eiweisskörper der Frauen und Kuhmilch, *Dissertation Inaugurale*. Strasbourg, 1876.
118. R. MALENFANT. — Technique simplifiée pour le dosage exact de la caséine et du lactose dans le lait de vache. *Journ. Pharm. Chimie*, 1912, (7), **6**, 390-397.
119. MALOUIN. — *Chimie Médicale*, Paris, 1750, **1**, 90.
120. MALY. — *Jahresbericht*, 1873, 123.
121. T. MARIE. — Recherches sur le pouvoir rotatoire de la caséine en solutions salines neutres. *Th. Doct. Méd.*, Toulouse, 1893.
122. C. J. MARTIN. — *Journ. of Physiol.*, 1894, 15.
123. M. MASCRÉ. — Sur la fixation du chondriome de la cellule végétale. *C. R. Ac. Sc.*, 1927, **185**, 866, et *C. R. Ac. Sc.*, 1929, **188**, 811.
124. M. MASCRÉ et E. BOUCHARA. — Influence du formol sur la précipitation des matières albuminoïdes du lait. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 994-1000.
125. M. MASCRÉ et M. HERBAIN. — Influence du formol sur la précipitation des matières azotées des sérums par l'acide trichloracétique. *C. R. Ac. Sc.*, 1929, **189**, 876, et Nouvelles expériences sur la précipitation des matières azotées des sérums en présence du formol. *C. R. Ac. Sc.*, 1930, **190**, 1205, ou : Influence du formol sur la précipitation des albumines sériques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 978-993.
126. G. MATTHAIPOULOS. — Feststellung des Äquivalentsgewichts des Kaseïns und eine neue Methode zur Bestimmung desselben. *Ztschr. für Anal. Chem.*, 1908, **47**, 492-501.
127. L. A. MAYNARD. — *Chemistry*, 1919, **23**, 145-154.
128. MEGGENHOFEN. — Dissert. inaug. sistens indigationem lactis muliebris chemicam. Francfort, 1826. Cité par SIMON [189].
129. G. MEILLÈRE et L. DE SAINT-RAT. — Dosage de l'azote total. Dispositif pour recueillir l'ammoniaque. Appli-

cation au dosage des albumines du lait. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1922 (7), **25**, 100.

130. M. MESTREZAT. — Notes de laboratoire sur l'emploi de quelques indicateurs colorés. L'alizarine-sulfonate de soude sensibilisé. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1920 (7), **21**, 185.
131. H. MEYER. — Beitrag zur Biochemie des Caseins. *Biochem. Ztschr*, 1926, **178**, 82-104.
132. E. MILON et A. COMMAILLE. — Analyse du lait. *C. R. Ac. Sc.*, 1864, **59**, 396-399.
133. E. MILON et A. COMMAILLE. — Nouvelle substance albuminoïde contenue dans le lait. *C. R. Ac. Sc.*, 1865, **59**, 301.
134. T. H. MILROY. — Ueber die Eiweiss-Verbindungen der Nucleinsäure und Thyminsäure und ihre Beziehung zu den Nucleinen und Paranucleinen. *Ztschr für physiol. Chem.*, 1896, **22**, 307-326.
135. R. MOOG. — Nouveau procédé de dosage dans le sérum de l'azote libérable par l'hypobromite de sodium. *C. R. Soc. Biol.*, 1912, **72**, 886.
136. Y. MORIMOTO. — Sur la teneur en urée du lait de vache. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1923, (7), **27**, 143-144. *Journ. Biochem. (Japan)*, I, 1922, p. 69; d'après Abstracts [1], 1922, **122**, 703.
137. MORIN. — Observations sur le lait. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1854, **25**, 423-434.
138. MUNK. — *Virchow's Arch.*, **134**, 515 et la suite.
139. NAQUET. — Principes de Chimie, 1867, 497.
140. NEUBECK. — De lacte. *Dissertation inaugurale*. Berlin, 1825.
141. J. H. NORTHROP. — *Journ. Gén. Physiol.*, 1920-21, **3**, 715.
142. — FR. OBERMAYER. — Ueber die Anwendung der Trichloressigsäure in der physiologisch-chemischen Analyse, *Wiener. Medic. Jahrbücher*, 1888, 375. Cité par *Ztschr. für. Anal. Chem.*, **29**, 114.
143. Th. B. OSBORNE et A. J. WAKEMAN. — The proteins of cow's milk. *Journ. of biol. Chem.*, 1918, **33**, 7-17, et Some new constituents of milk. A new protein soluble in alcohol. *Journ. of Biol. Chem.*, 1918, **33**, 243-251.

144. L. S. PALMER et R. G. SCOTT. — The physicochemical state of the protéins in cow's milk. *Journ. of Biol. Chem.*, 1919, **37**, 271-284.
145. A. PARMENTIER et N. DEYEUX. — Nouvelles recherches sur les différentes espèces de lait, 1805.
146. J. K. PARNAS et R. WAGNER. — Ueber die Ausführung von Bestimmungen Kleiner Stickstoffmengen nach Kjeldahl. *Biochem. Ztschr.*, 1921, **125**, 253-256.
147. G. PATEIN et L. DEVAL. — Recherches sur le dosage et les variations de la caséine dans le lait de femme. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1905 (6), **22**, 193-200.
148. R. PETERS. — Untersuchungen uber das lab. Rostock, 1894.
149. PÉTRI et Th. LEHMANN. — Die Bestimmung des Gesamstickstoffs im Harn. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1883-84, **8**, 200-213.
150. E. PFEIFFER. — Verschiedenes über Muttermilch. Berlin. *Klin. Wochenschrift*, 1882, et Kritische Untersuchungen über Muttermilch und Muttermilchanalysen. *Jahrbuch für Kinderheilkunde*, 1883, **19**.
151. PFEIFFER. — Jahresbericht der Thierchemie, 1884.
152. PFEIFFER. — Die analyse der Milch, 1887, 34.
153. J. E. PICHON-VENDEUIL. — Sur les amino-acides du lait. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1921, **28**, 360-367 et 404-413, ou *Th. Doct. Univ. (Sciences)*, Paris.
154. M. PIETTRE. — Sur les protéides du lactosérum. Leur séparation par la méthode à l'acétone. *C. R. Ac. Sc.*, 1924, **178**, 333.
155. M. PIETTRE. — Dosage des protéides du lait. *Journ. Pharm. Chim.*, 1924 (7), **30**, 48-49.
156. R. H. A. PLIMMER. — *Biochem. Journ.*, 1913, **7**, 43.
157. R. H. A. PLIMMER et W. M. BAYLISS. — The séparation of phosphorus from caseinogen by the action of enzymes and alkali. *Journ. of Physiol.*, 1905-1906, **33**, 439.
158. M. POLONOVSKI et A. LESPAGNOL. — Sur une semi-micro-méthode d'analyse rapide et complète du lait de femme. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 1195-1211.
159. POPPER. — Cité par SOMMERFELD dans son livre *Handbuch der Milchkunde*, 1909, 725.

160. CH. PORCHER. — Le lait au point de vue colloïdal. « Le Lait », 2, quai Chauveau, Lyon (5°).
161. S. POSTERNAK. — Sur le noyau phosphoré de la caséine. *C. R. Ac. Sc.*, 1927, **184**, 306.
162. F. PREGL. — *Abderhalden Handb.* Vol. 2, 1344, ou : La micro-analyse organique quantitative. Traduction d'après la 2^e édit. allemande par G. WELTER. Paris, 1923. Edit.: *Les Presses Universitaires*.
163. PROUST. — *Ann. Phys. Chim.*, 1819, **10**, 29.
164. RADENHAUSEN. — Die Frauenmilch. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1881, **5**, 13-30.
165. REH. — Hofmeister's Beitræge, 1907, **11**, 1-18.
166. L. REINER et A. MARTON. — Untersuchungen von Formaldehydeiweiss. Ein Fall von Divergenz der üblichen Stabilitätsmerkmale bei einer Umwandlung méchanismus der Gelbildung *Koll. Ztschr.*, 1923, **32**, 273-279.
167. CL. RIMINGTON. — Some phosphorus compounds of milk. Déphosphorised caseinogen. The action of alkali upon caseinogen. *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 204.
168. CL. RIMINGTON. — The phosphorus of caseinogen. Isolation of a phosphorus-containing peptone from tryptic digests of caseinogen. *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 1179-1186.
169. CL. RIMINGTON et H. D. KAY. — Some phosphorus compounds of milk. The liberation of phosphorus from caseinogen by enzymes and other agents. *Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 777-790.
170. H. RITTHAUSEN. — Neue methode zur analyse der milch und über ein vom milchzucker verschiedenes Kohlenhydrat in der Kuhmilch. *Journ. für prakt. Chem.*, 1877 (2), **15**, 329-349.
171. T. B. ROBERTSON. — Note on the synthesis of a Protein through the action of pepsin. *Journ. of Biol. Chem.*, 1907, **3**, 95-99.
172. T. B. ROBERTSON. — On the synthesis of paranuclein through the agency of pepsin and the chemical mechanics of the hydrolysis and synthesis of proteins through the agency of enzymes. *Journ. of Biol. Chem.*, 1908-1909, **5**, 493-523.

173. T. B. ROBERTSON. — *Chemistry*, **14**, 377-932.
174. T. E. ROBERTSON. — *Journ. Ind. Eng. Chem.*, 1909 (1), 723.
175. RONCHÈSE. — Méthode de dosage de quelques composés azotés. *Th. Doct. Pharm.*, Paris, 1908.
176. J. ROUX. — Sur le dosage de la caséine dans le lait de vache. *Moniteur Scientifique*, 1891, **37-38**, 4, (5), 478-482.
177. O. SACKUR. — *Ztschr. physik Chem.*, 1902, **41**, 672-680.
178. E. SALKOWSKI. — Ueber die Paranucleinsaeure aus Casein. *Ztschr. für Physiol. Chem.*, 1901, **32**, 245-267.
179. SALKOWSKI et HAHN. — *Pflüger's Arch.*, 1895, **59**, 225.
180. H. SCHIFF. — *Liebig's Ann.*, **299**, 25 et 301; **310**, 25; **319**, 59 et 287, **325**, 348. *Ber. d. Deutsch Chem. Ges.*, **29**, 298, 1354.
181. A. SCHLOSSMANN. — Ueber die Eiweissstoffe der Milch und die methoden ihrer Trennung. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1896-97, **22**, 197-226.
182. SCHMIDT-MUHLHEIM. — *Pflüger Arch. f. d. gesammte Physiol.*, 1882, **28**, 287.
183. SCHMIDT-MUHLHEIM. — *Pflüger's Arch.*, **30**, 383.
184. SCHUBLER. — Untersuchungen über die milch und ihre Bestandtheile, 1817.
185. SCHWARZ (Léo). — Ueber Verbindungen der Eiweisskörper mit Aldehyden. *Ztschr. für phys. Chem.*, 1896-97, **31**, 460-478.
186. J. SEBELIEN. — Beitrag zur Kenntniss der Eiweisskörper der Kuhmilch. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1885, **9**, 445-464.
187. J. SEBELIEN. — Studien über die analytische Bestimmungsweise der Eiweisskörper mi besonderer Rücksicht auf die milch. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1889, **13**, 135-180. D'après l'original danois dans : « Oversigt of det kgl. danske Videnskabernes selskabs Forhandling, 1888 ».
188. A. SIMÉON. — Constitution des protides. *Th. Pharm. sup.*, Lyon, 1928.
189. SIMON. — *Medicinisch Anal. Chem.*, 1840, 72.

190. G. SIMON. — Beitrag zur Kenntniss der Eiweisskoerper der Kuhmilch. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1901, **33**, 466-541.
191. SOLDNER. — Die Salze der milch und ihre Beziehungen zu dem Verhalten des Caseins. *Landwirth. Versuchstation*. 1888, **35**, 351.
192. SOXHLET. — *Bull. Soc. Chim.*, 1873, **20**, 415.
193. R. STEINEGGER. — Contribution à l'action de la connaissance du formol sur le lait. Travail de la station fédérale d'essais pour l'industrie laitière dirigée par O. Jensen. *Landwirtschaftliches Jahrbuch der Schweiz*, 1905, **8**.
194. STENBERG. — *Nordiskt medicinskt Arkiv*, 1882.
195. F. STOHMANN. — Milch und molkereiprodukte, 1898. Cité par Simon [190].
196. M. STORCH. — *Mon. f. Ch.*, 1897, **18**, 244-281.
197. STORCH. — Mikroskopiske og Kemiske Undersoegelser over Smoerdannelsen ved Kaerning. *Copenhagen*, 1883.
198. V. STORCH. — 36^e Rapport du laboratoire d'expériences agronomiques de l'Institut Royal vétérinaire et agricole de *Copenhagen*, 1897, cité par A. MONVOISIN : *Le lait et les produits dérivés*, 3^e édition, tome I^{er}, Paris, Vigot frères, éditeurs, 1925.
199. STUTZER. — *Journ. für Landwirthschaft*, 1881, 473 et la suite.
200. E. SUTERMEISTER. — Casein and its industrial applications. *The Chemic. Catalog Company*, Ed. New-York, 1927. Rapporté par PORCHER [160].
201. TARASZEWICZ. — Einige Méthoden zur Werthbestimmung der Milch. *Dorpat*, 1872.
202. H. TIEMANN. — Untersuchungen über die Zusammensetzung des Kolostrums mit besonderer Berücksichtigung der Eiweissstoffe desselben. *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1898, **25**, 363-392.
203. R. W. TITUS, H. H. SOMMER et E. B. HART. — The nature of the protein surrounding the fat globules in milk. *Journ. of biol. Chem.*, 1928, **76**, 237-249.

204. TOLMATSCHIEFF. — Zur analyse der milch. Hoppe Seyler [86].
205. F. TRENDTEL. — Ueber individuelle Verschiedenheiten des isoelektrischen Punktes beim Frauenmilchcasein. *Biochem. Ztschr.*, 1927, **180**, 371-376.
206. TRILLAT et SAUTON. — Le dosage de la matière albuminoïde du lait. Etude d'un nouveau procédé. *Ann. Inst. Pasteur*, 1906, **20**, 991-1004.
207. UNGNADE. — Arbeiten des deutschen milchwirtschaftlichen Reichsverbandes, **49**, 1921.
208. L. L. VAN SLYKE. — The determination of albumen in cow's milk. *Journ. of Amer. Chem. Soc.*, 1894, **16**, 712-715.
209. L. L. VAN SLYKE et J. C. BAKER. — The preparation of pure casein. *Journ. of Biol. Chem.*, 1918, **35**, 127-136, et : L. L. VAN SLYKE. — The Chemistry of casein. *Proceedings of the worlds dairy congress*, 1923, **2**, 1145.
210. L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH. — Method of preparing ash-free casein and paracasein. *Journ. of Biol. Chem.*, 1913, **14**, 203-206.
211. L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH. — Preparation and composition of unsaturated or acid caseinates and paracaseinates. *Journ. of biol. Chem.*, 1913, **14**, 211-225.
212. L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH. — Condition of casein and salts in milk. *Journ. of biol. Chem.*, 1915, **20**, 135-152.
213. L. L. VAN SLYKE et A. W. BOSWORTH. — Chemical changes in the souring of milk. *Journ. of biol. Chem.*, 1916, **24**, 191-202.
214. L. L. VAN SLYKE et O. B. WINTER. — Preparation, composition and properties of caseinates of magnesium. *Journ. of Biol. Chem.*, 1914, **17**, 287-291.
215. A. VILLIERS et E. COLLIN. — Traité des altérations et falsifications des substances alimentaires. Paris, Doin, 1900.
216. R. VLADESCO. — Teneur en phosphore de la caséine. *C. R. Soc. Biol.*, 1924 (7), **91**, 512.

217. C. VOEGTLIN et C. P. SHERWIN. — Adénine and guanine in cow's milk. *Journ. of Biol. Chem.*, 1918, **33**, 145-149.
218. A. WERNER. — Neuere Anschauungen auf dem Gebiete der anorganischen Chemie, 3^e éd., Brunswick, 1913.
219. Th. WEYL. — Bericht der deutschen chemischen Gesellschaft, **11**, 2176.
220. WILLDENOW. — *Inaug. Dissert.* Bern. 1893.
221. WOLTELEN. — 1775.
222. A. WROBLEWSKI. — Beitræge zur Kenntniss des Frauen-caseins und seiner Unterschiede vom Kuhcasein. *Th. Doct. ès sc.* Berne, 1894.
223. F. W. ZAHN. — Untersuchungen über die Eiweisskörper der milch. *Pflüger's Archiv*, 1869, **2**, 598.
224. F. W. ZAHN. — *Pflüger's Archiv*, 1870, **3**, 76.
225. ZAITSCHECK. — *Pflüger's Arch.*, **104**, 550.
226. J. ZAYKOWSKY. — Das optische Drehungsvermoegen und das molékulargewicht des caseins. *Biochem. Ztschr.*, 1923, **137**, 562-569.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

Première Partie

CHAPITRE I

Historique de la composition azotée du lait.....	3
--	---

CHAPITRE II

ETUDE DES CONSTITUANTS AZOTÉS DU LAIT

A) LA CASÉINE

1° Proportion	11
2° Solubilité	12
3° Pouvoir rotatoire.....	13
4° Caractère amphotère.....	14
5° Composition élémentaire.....	16
6° Constitution	17

B) LA LACTALBUMINE.....	22
-------------------------	----

C) LA LACTOGLOBULINE.....	23
---------------------------	----

D) L'AZOTE RESIDUEL.....	24
--------------------------	----

Deuxième Partie

PROCÉDÉS ANALYTIQUES DE SÉPARATION DES CONSTITUANTS AZOTÉS DU LAIT

CHAPITRE I

DOSAGE EN BLOC DES PROTÉINES

1° Par différence.....	29
2° Directement	31

TABLE DES MATIERES

Précipitation par :	
a) L'alcool	32
b) Les sels de métaux lourds.....	33
c) L'acide tannique.....	36
d) L'acide trichloracétique.....	37
e) L'acide métaphosphorique.....	38
f) L'asaprol	38
g) L'acide phosphotungstique.....	39
h) Méthodes au formol.....	41

CHAPITRE II

MÉTHODES DE DOSAGE DE LA CASÉINE

1° Filtration.....	43
2° Précipitation par les acides	
a) Méthode de Hoppe-Seyler.....	44
b) Méthode de Milon et Commaille.....	45
3° Précipitation par les sels	
a) Méthode à l'alun (Schlossmann).....	46
b) Méthode au sulfate de magnésium (Mitscherlich)....	47
4° Dosage à partir du lait dégraissé.....	49

CHAPITRE III

Méthodes de préparation de la caséine pure.....	53
---	----

CHAPITRE IV

SÉPARATION DE LA LACTALBUMINE

1° Par la chaleur.....	61
2° Par la méthode de Piettre.....	62

Troisième Partie

EXPOSÉ DES MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISÉES AU COURS DE CE TRAVAIL

CHAPITRE I

MODE DE DOSAGE DE L'AMMONIAQUE

1° Destruction sulfurique des substances azotées.....	67
2° Dosage de l'ammoniaque :	
a) Examen critique de la méthode au formol de Ronchèse	68
b) Technique par distillation.....	70
3° Méthode de dosage du phosphore dans la caséine.....	73

Quatrième Partie

Action qualitative du formol sur les protéines du lait.....	77
---	----

CHAPITRE I

INFLUENCE DU FORMOL SUR LA PRÉCIPITATION QUANTITATIVE DES PROTÉINES DU LAIT

1° Cas de l'acide acétique.....	83
2° Cas de l'acide trichloracétique.....	87
3° Cas de l'acide lactique.....	93
4° Cas de l'acide citrique.....	96

CHAPITRE II

ANALYSE DES PHÉNOMÈNES OBSERVÉS

Libération d'acidité due au formol.....	101
---	-----

CHAPITRE III

ESSAI EXPLICATIF DES PHÉNOMÈNES OBSERVÉS

Caséine pure. Préparation et constantes.....	105
Action du formol sur le mélange synthétique « Caséine + Sérine Globuline ».....	108
Action du formol sur le mélange synthétique « Caséine + Peptone ».....	116
Conclusions	121

Cinquième Partie

LAIT DE FEMME

CHAPITRE I

1° Généralités	125
2° Sa caséine :	
a) Rapports avec celle du lait de vache.....	126
b) Méthodes de dosage.....	129

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE II

Influence du formol sur la précipitation de ses protéines.....	135
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	143
BIBLIOGRAPHIE	147

